

NSAIDs og beskyttelse mot kreft: COX-avhengige eller COX-uavhengige mekanismer?

Masteroppgave i farmakologi

Marie Ellingsen



Farmakologisk Institutt, Institutt for klinisk medisin, Det medisinske
fakultet og

Farmasøytisk Institutt, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2010

Forord

Masteroppgaven ble utført ved Farmakologisk Institutt, Universitetet i Oslo, i tidsrommet juni 2009 til mai 2010. Dagny Sandnes har vært eksternveileder, mens Hege Thoresen har vært internveileder. Jeg vil takke Dagny Sandnes for god oppfølging og faglig veiledning gjennom hele perioden, både når det kommer til forberedelse og utførelse av labarbeid, og under skriveprosessen.

Høy faglig kompetanse og et trivelig arbeidsmiljø har i stor grad bidratt til at dette har vært en utfordrende og lærerik tid. En stor takk rettes også til Ellen Johanne Johansen, Renuka Patel, Eva Østby, Monica Aasrum og John Ødegård for hjelp med det praktiske arbeidet og nyttige råd underveis. I tillegg vil jeg takke resten av avdelingen for at jeg er blitt tatt godt i mot.

Helt til slutt vil jeg takke familie og venner som i stor grad har motivert og støttet meg gjennom hele farmasistudiet.

Oslo, mai 2010

Marie Ellingsen

Innhold

FORORD	1
INNHold	2
FORKORTELSER	5
SAMMENDRAG.....	8
1. INNLEDNING	10
1.1 BAKGRUNN FOR OPPGAVEN	10
1.2 KREFT	10
1.3 IKKE-STEROIDE ANTIINFLAMMATORISKE LEGEMIDLER (NSAIDs)	11
1.4 CYCLOOKSYGENASE.....	11
1.4.1 Prostaglandin E_2 (PGE_2).....	12
1.4.2 COX-2 og PGE_2 -ekspresjon ved colorektale tumorer.....	13
1.4.3 COX-uavhengige mekanismer av NSAIDs og COX-2 hemmere.....	15
1.5 PEROKSISOM-PROLIFERATOR-AKTIVERTE RESEPTORER (PPARs).....	16
1.5.1 $PPAR\gamma$	18
1.6 LIGANDER BRUKT I FORSØKENE.....	20
1.7 HENSIKT OG SPESIFIKKE PROBLEMSTILLINGER FOR OPPGAVEN	21
2. MATERIALER OG METODER	22
2.1 MATERIALER	22
2.1.1 Kjemikalier.....	22
2.1.2 Primere.....	23
2.1.3 Isotop.....	23
2.1.4 Medium.....	23

2.1.5	<i>Antistoff</i>	23
2.1.6	<i>Løsninger</i>	24
2.2	CELLELINJENE.....	29
2.3	CELLEFORSØK.....	30
2.3.1	<i>cAMP-assay</i>	30
2.3.2	<i>Proteinmåling</i>	32
2.3.3	<i>RNA-isolering</i>	33
2.3.4	<i>Kvalitativ PCR (gel)</i>	35
2.3.5	<i>Kvantitativ PCR</i>	38
	BEREGNINGER OG STATISTISK ANALYSE.....	44
3.	RESULTATER	45
3.1	ETT DØGN SERUMFRITT VS. TO DØGN SERUMFRITT.....	45
3.2	EFFEKT AV ROSIGLITAZON I HT29-CELLER.....	45
3.2.1	<i>Stimulering av cellene med PGE₂</i>	45
3.2.2	<i>Stimulering av cellene med forskolin</i>	47
3.2.3	<i>Stimulering av cellene med isoprenalin</i>	48
3.3	DOSEAVHENGIG EFFEKT AV ROSIGLITAZON OG NSAIDS.....	50
3.3.1	<i>Rosiglitazon</i>	50
3.3.2	<i>Indometacin</i>	51
3.3.3	<i>Sulindaksulfid</i>	52
3.3.4	<i>Meklofenamsyre</i>	53
3.4	EFFEKT AV 10 µM GW9662.....	54
3.5	EFFEKT AV ROSIGLITAZON PÅ HCT116-CELLER.....	56
3.5.1	<i>Stimulering av cellene med PGE₂</i>	56

3.5.2	<i>Stimulering av cellene med forskolin</i>	57
3.6	KONTROLL AV RNA	58
3.7	KONTROLL AV PRIMERE.....	59
3.8	KVANTITATIV PCR.....	60
3.9	CYTOTOKSISITET	61
4.	DISKUSJON	63
4.1	METODOLOGISKE ASPEKTER.....	63
4.1.1	<i>Dyrking av celler i serumfritt medium 1 døgn vs. 2 døgn</i>	63
4.1.2	<i>Kvaliteten av RNA</i>	64
4.1.3	<i>Kvantitativ PCR</i>	65
4.2	ER EFFEKTEN AV ROSIGLITAZON SPESIFIKK FOR EP2-RESPONSEN?	65
4.3	EFFEKT AV GW9662	67
4.4	UTØVER NSAIDS NOEN AV SINE EFFEKTER VIA PPAR γ ?	70
4.5	KAN PPAR γ -AKTIVERING NEDREGULERE EP2- (OG EP4-) RESEPTORNIVÅET?	71
4.6	OPPTRER EFFEKTENE AV NSAIDS VED KONSENTRASJONER SOM ER KLINISK RELEVANTE? ...	73
4.7	KONKLUSJON.....	74
	KILDELISTE	75

Forkortelser

15d-PGJ ₂	15-Deoksy-Delta-12,14-prostaglandin J2
15-PGDH	15-hydroksyprostaglandin dehydrogenase
AC	Adenylyl cyklase
ADRP	Adipose differentiation-related protein
AP-1	Aktivator protein-1
APC	Adenomatøs polyposis coli
ATF3	Aktiverende transkripsjonsfaktor 3
BSA	Bovin serum albumin
cAMP	Adenosin 3',5' cyclisk monofosfat
Cdk	Cyklin-avhengig kinase
COX	Cyklooksygenase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DPM	Desintegrasjoner per minutt
E.coli	Escherichia coli
Egr-1	Tidlig vekstresponsfaktor 1
ER	Endoplasmatisk retikulum
Erk	Ekstracellulært signal-regulert kinase
GAPDH	Glyseraldehyd-3-fosfat-dehydrogenase
GPCR	G-protein koblet reseptor
GW9662	2-klor-5-nitro benzanilid
Hepes	N-hydroksyetylpipezazin-N-etansulfonat

IBMX	3-isobutyl-1-metylxanthin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisfosfat
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
K _d	Dissosiasjonskonstant
KRH	Krebs-Ringer-Hepes
MAPK	Mitogenaktivert proteinkinase
NAG-1	NSAIDs-indusert gen 1
NF-κB	Nukleær faktor kappaB
NSAID	Ikke-steroid antiinflammatorisk legemiddel
OD	Optisk tetthet
PCR	Polymerase kjedereaksjon
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF ₂	Prostaglandin F ₂
PGG ₂	Prostaglandin G ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostasyklin
PGJ ₂	Prostaglandin J ₂
PI3K	Fosfoinositid 3-kinase
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PPAR	Peroksisom-proliferator-aktivert reseptor
PPRE	Peroksisom-proliferator-responsivt element
PTEN	Fosfatase og tensinhomolog
RNA	Ribonukleinsyre
RPM	Omdreiningar per minutt

RT-PCR	Real time PCR
RXR	Retinsyrereseptor
TAE	Tris base, Eddiksyre (Acetic acid), EDTA
TCA	Trikloreddiksyre
TGF β	Transformerende vekstfaktor β
TXA ₂	Tromboksen A ₂
TZD	Tiazolidindion
UV	Ultrafiolett
VEGF	Vaskulær endotelial vekstfaktor

Sammendrag

Det er veldokumentert at et jevnlig inntak av ikke-steroid antiinflammatoriske legemidler (NSAIDs) kan redusere risikoen for kreftutvikling, blant annet i tykktarmen. Det antas at denne effekten skyldes hemming av cyklooksigenase (COX)-aktiviteten, det hastighetsbestemmende trinnet i prostaglandinsyntesen. Det finnes imidlertid flere holdepunkter for at NSAIDs utøver antikarsinogene effekter uavhengig av COX. Hensikten med oppgaven var å undersøke om effekter av NSAIDs medieres via peroksisom-proliferator-aktivert reseptor γ (PPAR γ) og om reseptoraktiveringen forekom i konsentrasjoner som er klinisk relevante. Fordi tidligere rapporter har vist at PPAR γ -aktivering nedregulerer EP-reseptorer i tumorcellelinjer, ble PGE₂-stimulert cAMP-akkumulering studert.

Det ble benyttet HT29-celler, som er en cellelinje isolert fra human coloncancer. Cellene ble forbehandlet med PPAR γ -agonisten rosiglitazon, samt indometacin, sulindaksulfid og meklofenamsyre, som er ulike NSAIDs. Cellene ble deretter stimulert med PGE₂ for å måle PGE₂-stimulert cAMP-produksjon, som er et indirekte mål på reseptormengde. Forbehandling med samtlige ligander gav en redusert cAMP-produksjon, men effekten var bare signifikant ved de høyeste konsentrasjonene, sammenlignet med kontroll. Dette er forenlig med en PPAR γ -mediert effekt. Forsøk på å bekrefte at effekten av rosiglitazon og de ulike NSAIDs var mediert via PPAR γ ble gjort ved å anvende en PPAR γ -antagonist, GW9662, men disse forsøkene gav ingen sikker konklusjon. Da cAMP-assay er en indirekte metode for å undersøke om cellenes EP-reseptornivå er endret, ble det undersøkt om forbehandlingen førte til nedregulering av EP2-reseptorer. Mengden EP2 mRNA ble målt ved bruk av kvantitativ PCR. Disse forsøkene viste at det kun var meklofenamsyre (100 μ M) som gav en signifikant reduksjon i EP2 mRNA-nivået sammenlignet med kontrollen. Sulindaksulfid (10 μ M) viste også en svak nedregulering av EP2 mRNA, men denne effekten var ikke signifikant.

Resultatene er forenlige med at NSAIDs kan utøve effekter via PPAR γ , men kun i høyere konsentrasjoner, som også viser tegn til cytotoxiskitet. Det vil være nødvendig med ytterligere studier for å avklare om den reduserte PGE₂-stimulerte cAMP-produksjonen skyldes PPAR γ -aktivering. I tillegg kreves det ytterligere undersøkelser av ligandenes evne til å nedregulere nivået av EP2 mRNA i HT29-cellene.

1. Innledning

1.1 Bakgrunn for oppgaven

Det foreligger dyreeksperimentelle, epidemiologiske og kliniske studier som dokumenterer at et jevnlig inntak av ikke-steroid antiinflammatoriske legemidler (NSAIDs) eller hemmere av cyklooksygenase-2 (COX-2) kan redusere risikoen for kreftutvikling, blant annet i tykktarmen [1-6]. Det antas at den beskyttende effekten primært skyldes hemming av den enzymatiske aktiviteten til cyklooksygenase (COX), som er det hastighetsbestemmende trinnet i prostaglandinsyntesen. Imidlertid er det vist at NSAIDs hemmer proliferasjon og induserer apoptose i tumorceller som ikke uttrykker COX-enzymet. Det er av den grunn foreslått en rekke andre mekanismer som NSAIDs kan utøve effekt gjennom, blant annet via peroksisom-proliferator-aktiverende reseptorer (PPARs) [7-9].

1.2 Kreft

Kreft kjennetegnes ved ukontrollert cellevekst. Normale celler blir til kreftceller når det oppstår mutasjoner i DNA. Genetiske endringer som aktivering av proto-onkogener til onkogener (kreftfremkallende gen) og redusert uttrykk av tumorsuppressorgener, gjør at kreftcellene opptrer autonomt og unngår de strenge kontrollfunksjoner som forekommer ved normal celledeling [10, 11].

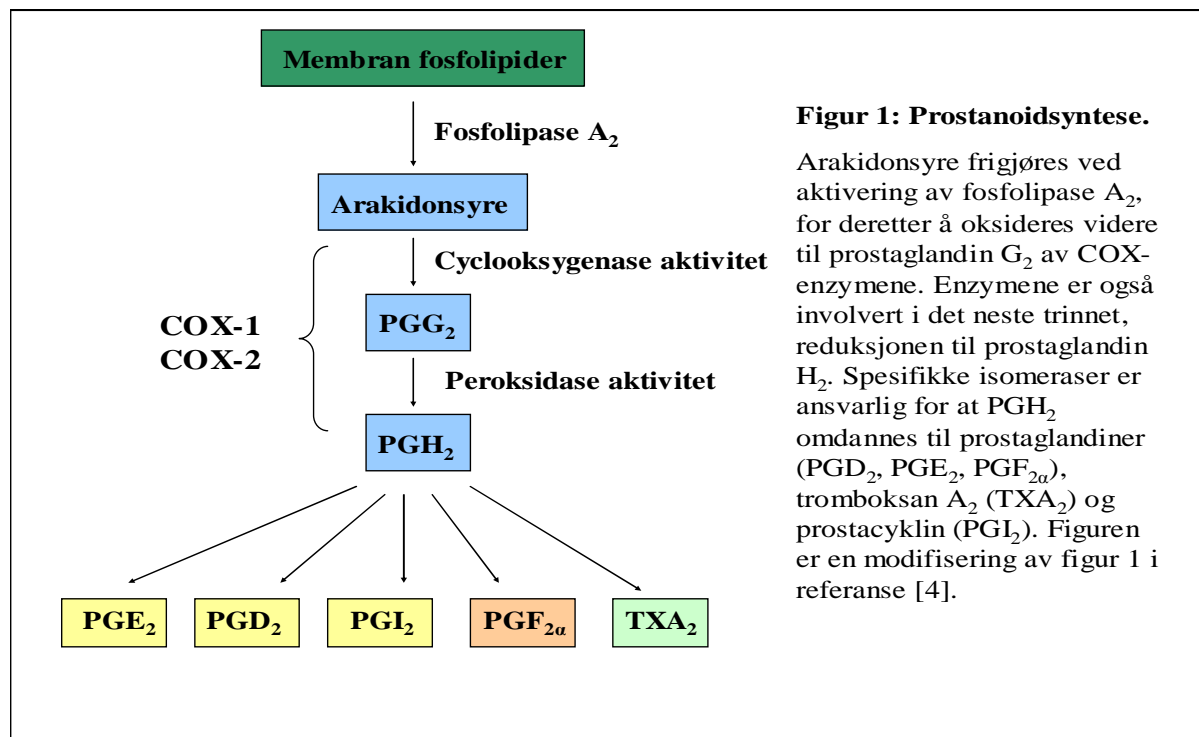
1.3 Ikke-steroide antiinflammatoriske legemidler (NSAIDs)

Ikke-steroide antiinflammatoriske legemidler (NSAIDs) er en av de legemiddelgruppene som er mest brukt verden over [12]. Legemidlene forskrives med den hensikt å utøve symptommodifiserende effekter blant annet ved revmatiske lidelser [13]. Legemiddelgruppen har tre farmakologiske effekter; antiinflammatorisk, analgetisk og antipyretisk. Disse effektene skyldes primært hemming av COX-enzymene, som vil forårsake redusert prostaglandinproduksjonen [12]. Flere studier viser at NSAIDs utøver antitumoraktivitet i form av hemmet celleproliferasjon, induisert apoptose og hemmet angiogenese [1, 3], men i konsentrasjoner som er høyere enn det som er nødvendig for å hemme COX-aktiviteten. Samtidig er det observasjoner som indikerer at NSAIDs også forårsaker disse effektene via mekanismer uavhengig av hemmet COX-aktivitet [1, 8, 9].

1.4 Cyclooxygenase

Cyclooxygenase (COX) er lokalisert i endoplasmatisk retikulum (ER) og kjernemembranen [14]. Det er et bifunksjonelt membranbundet hemprotein, som både katalyserer cyclooxygenase- og peroksidasereaksjonen i arakidonsyrekaskaden [4]. COX-enzymet forekommer hovedsakelig i to isoformer; COX-1 og COX-2. Det som skiller de to formene fra hverandre er kroppsdistribusjonen og deres fysiologiske funksjon [1]. COX-1 er konstitutivt uttrykt i mange vev. Enzymet forsyner vevene med prostaglandiner som er nødvendig for å opprettholde fysiologisk organfunksjon, som beskyttelse av slimhinnen i gastrointestinaltrakten, regulering av blodkar og kontroll av blodplateaggregering. COX-2 er derimot upåviselig i de fleste vev, bortsett fra i menneskets hjerne, endotelceller, tykktarm og nyre. Enzymet induseres av blant annet cytokiner, vekstfaktorer og onkogener [5, 7].

Både COX-1 og COX-2 er involvert i prostanoidsyntesen (figur 1). De katalyserer det hastighetsbestemmende trinnet i metabolismen av arakidonsyre [15], en flerumettet fettsyre som dannes ved at fosfolipider og triglyserider hydrolyseres. Enzymet fosfolipase A₂ (PLA₂) kløyver fosfolipidene og frigjør arakidonsyre inn i cytosolen, hvor det fungerer som forløper til prostaglandinproduksjonen [1]. COX-enzymene katalyserer oksidasjonen av arakidonsyre til prostaglandin G₂ (PGG₂) og videre reduksjonen til prostaglandin H₂ (PGH₂). PGH₂ er et ustabilt produkt og vil raskt omdannes til ulike prostanoider (PGD₂, PGE₂, PGF₂), prostasyklin (PGI₂) og tromboksan A₂ (TXA₂) ved hjelp av spesifikke isomeraser [4].



1.4.1 Prostaglandin E₂ (PGE₂)

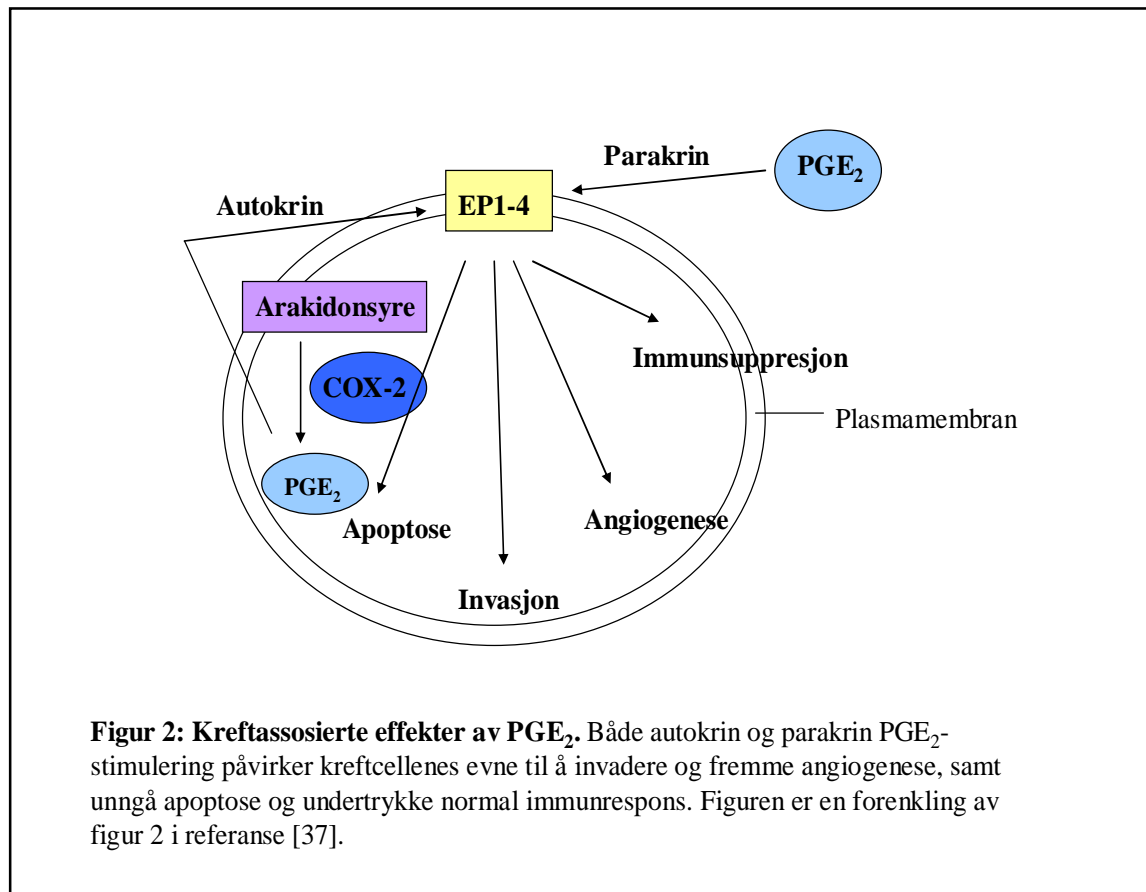
Prostaglandiner fungerer som autokrine eller parakrine signalmolekyler som kontrollerer ulike celledfunksjoner i det omkringliggende området. Prostaglandinene er involvert i flere biologiske prosesser, blant annet inflammasjon, beinmetabolisme, sårtilheling, nyrefunksjon, angiogenese og immunrespons [16, 17].

Prostaglandin E₂ (PGE₂) er en av hovedmetabolittene i prostanoidsyntesen, og er tilstede gjennom hele gastrointestinaltrakten. PGE₂ utøver en rekke effekter i gastrointestinaltrakten, inkludert kontroll av syre- og bikarbonatsekresjonen, slimproduksjonen, samt beskyttelse av slimhinnen. Farmakologiske studier har klassifisert PGE₂-reseptorene i fire spesifikke transmembrane G-proteinkoblede undergrupper; EP1-EP4, som skiller seg fra hverandre ved å ha ulik signaltransduksjon og vevslokalisasjon [17]. EP1 mobiliserer intracellulært kalsium via mekanismer som ikke er endelig avklart, selv om det ofte antas at det skjer via G_q-koblet aktivering av fosfolipase C og inositol-1,4,5-trisfosfat (IP₃). Aktivering av EP2- og EP4-reseptorene gir et økt nivå av cAMP i cellene via kobling til G_s proteinet som kopler til adenylyl cyclase (AC) [17-19]. PGE₂-stimulering av EP4 er også vist å føre til fosfoinositid 3-kinase (PI3K)-avhengig fosforylering av Erk1/2 (cellulære signal-regulerte kinaser), men kan også være involvert i β-catenin signalveien [20, 21]. EP3 reseptoren forekommer i flere isoformer, og gjennom binding til G_i protein og delvis G_s protein kan reseptoraktiveringen medføre både redusert og økt nivå av cAMP, samt en økt mengde intracellulært kalsium via aktivering av G_q [17]. I noen tilfeller kan enkelte prostaglandiner og deres metabolitter også binde seg til kjernereseptorer som peroksisom-proliferator-aktivererte reseptorer (PPAR) [22].

1.4.2 COX-2 og PGE₂-ekspresjon ved colorektale tumorer

Normalt er det lav ekspresjon av COX-2 i tykktarmens slimhinne. Det er derimot observert økt COX-2 ekspresjon ved coloncancer, både på mRNA- og protein-nivå [4, 5]. Et økt COX-2 nivå i epitelceller, stromale celler og inflammasjonsceller (makrofager, leukocytter) fører til dannelse av ulike prostaglandiner, som igjen vil fremme angiogenese, beskytte mot apoptose, stimulere celleproliferasjon, indusere metastase og undertrykke celle-medierte immunresponser (figur 2). PGE₂ er det dominerende prostaglandinet som formidler COX-2 sin tumor-fremmende funksjon ved coloncancer. PGE₂-nivået er signifikant økt både ved benigne og maligne svulster

sammenlignet med normalt vev [18, 22]. Overuttrykk av COX-2 i primær svulst er assosiert med dårlig klinisk prognose [4].



I colorektale svulster er COX-2 lokalisert både i epitelceller og nærliggende stromale celler. COX-2-produserte prostaglandiner vil kunne fremme tumorutvikling ved å virke på de maligne epitelcellene, ved å stimulere proliferasjon, hemme apoptose eller stimulere migrasjon og metastasering. I tillegg kan prostaglandiner utøve effekt på omliggende stromale celler. Det er sett at økt COX-2 ekspresjon kan modifisere tumorveksten ved å stimulere fibroblastenes sekresjon av flere angiogene vekstfaktorer, noe som stimulerer angiogenesen. COX-2 er også tilstede i endotelceller i tumoren og det er dokumentert at COX-2-hemmere kan blokkere vandringsen av disse cellene, samt blokkere vekstfaktor-indusert angiogenese. I tillegg kan prostaglandiner påvirke makrofager og andre immunceller i svulsten [6].

1.4.3 COX-uavhengige mekanismer av NSAIDs og COX-2 hemmere

Det er gjort flere funn som reiser tvil om at NSAIDs og COX-2 hemmere kun utøver antikarsinogene effekter via hemming av COX-enzymene. Det er vist at enkelte NSAIDs kan hemme proliferasjonen og indusere apoptose i celler som ikke uttrykker COX [1]. Både sulindaksulfid og piroxicam induserte apoptose i HT29-celler (COX-2 positive), og i HCT15-celler (COX-2 negative) [8]. Dette tyder på at det i tillegg til COX-avhengige mekanismer, også finnes mekanismer uavhengig av COX, som bidrar til den antikarsinogene aktiviteten til tradisjonelle NSAIDs. Det ser imidlertid ut som om de ulike NSAIDs har mer eller mindre egne, spesifikke COX-uavhengige angrepspunkter [23]. De COX-uavhengige mekanismene som er foreslått å skulle bidra til antitumoraktivitet, er sett i konsentrasjoner som er betydelig høyere (10-1000 ganger) enn det som er nødvendig for å hemme prostaglandinsyntesen [7, 9].

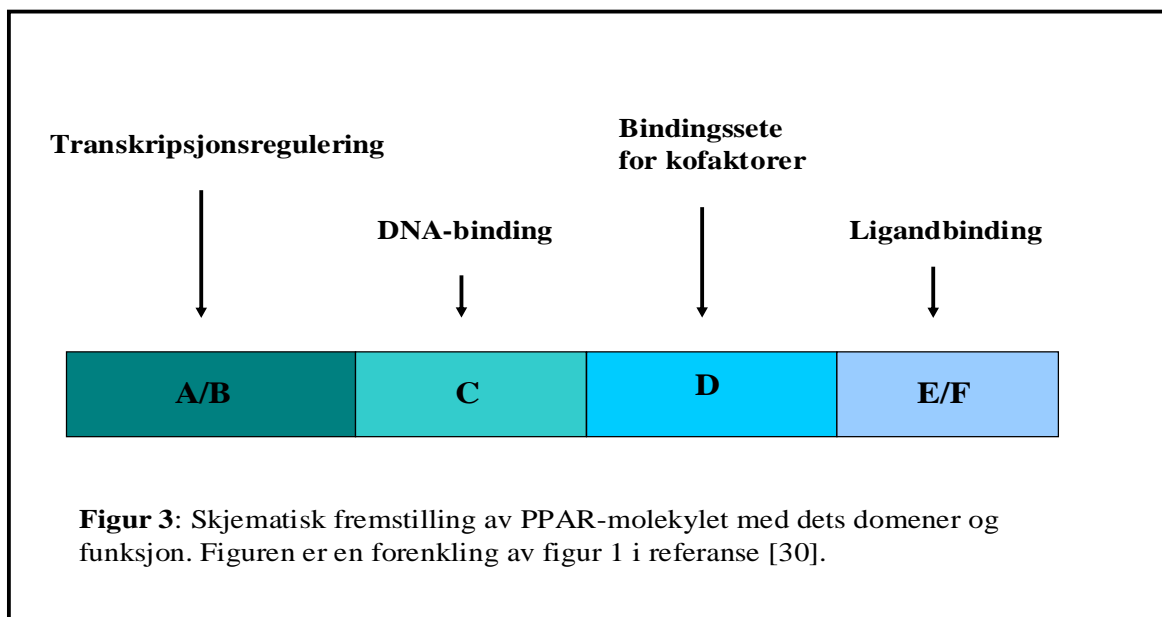
Det er påvist flere COX-uavhengige mekanismer. NSAIDs kan hemme transkripsjonsfaktorene NF- κ B og AP-1, som blant annet fremmer celleoverlevelse og forsterker proliferasjonen, samt fungerer som sentrale mediatorer ved immunrespons. Denne effekten forekommer enten ved direkte hemming eller via endringer av aktiviteten til cellulære kinaser [1, 7]. Videre er det klart at NSAIDs kan endre MAP kinasekaskader ved å aktivere JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) og p38 MAPK, en effekt som fremmer apoptose, samt blokkere aktiveringen av Erk-1 og -2, som vil redusere celleveksten. Det er vist at HCT116-celler stimulert med ulike NSAIDs gav økt nivå av NAG-1 (NSAIDs-indusert gen 1, et gen som koder for en vekstfaktor beslektet med TGF β) [24, 25], som er postulert å være et tumorsuppressorgen. Cellesyklusen er regulert av cykliner og cyklinavhengige kinaser (Cdk). NSAIDs kan ved å hemme disse, forhindre videre celledeling [7]. Videre er det også holdepunkter for at NSAIDs-mediert apoptose involverer kjernereseptorene peroksisom-proliferator-aktiverte reseptorer (PPAR) [1, 7]. PPAR γ er uttrykt i tykktarmen, og viser økt ekspresjon i bryst-, prostata- og tykktarmskreft. Det er vist at enkelte PPAR γ -agonister

kan indusere differensiering og apoptose i tumorceller, og dette ligger til grunn for å tro at PPAR γ undertrykker tumorcelleproliferasjon [7].

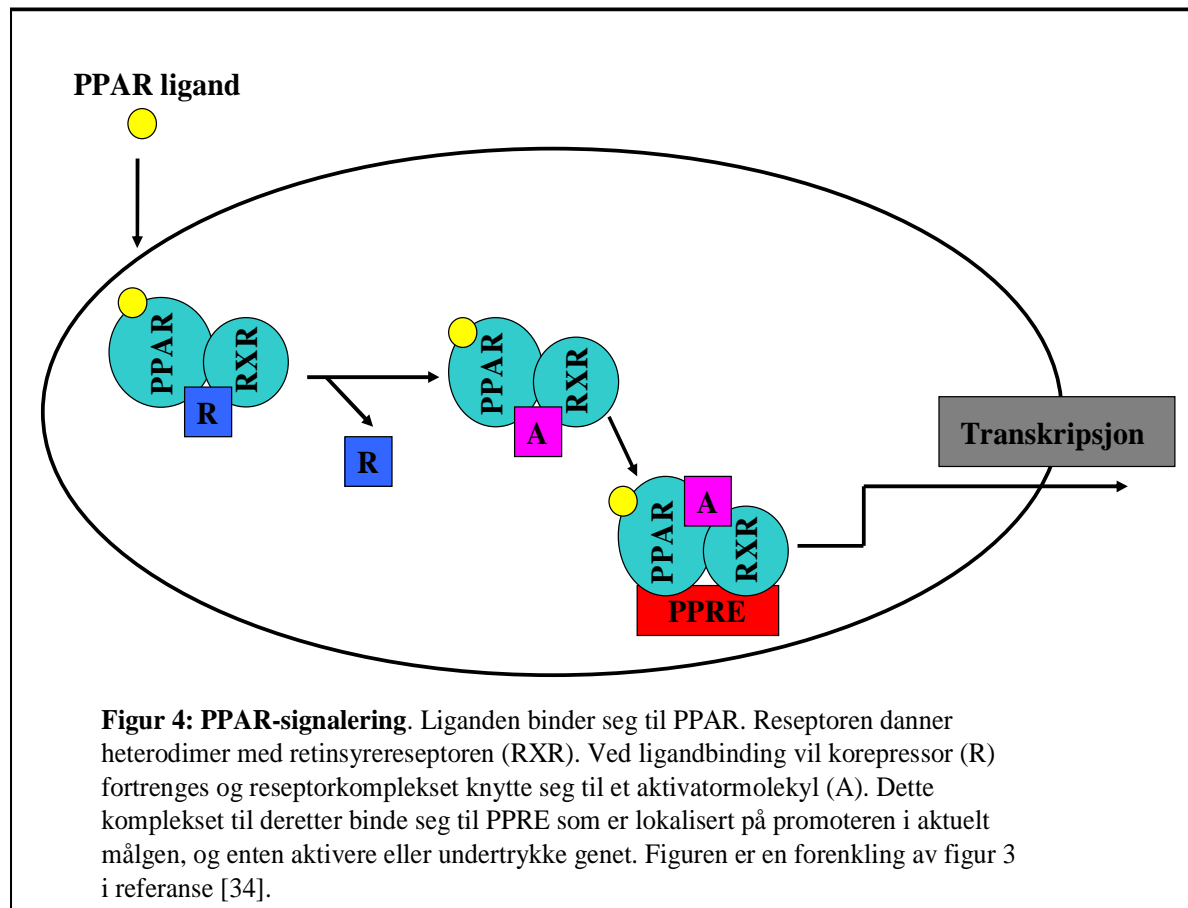
1.5 Peroxisom-proliferator-aktiverte reseptorer (PPARs)

Peroxisom-proliferator-aktiverte reseptorer (PPARs) tilhører kjernereseptorfamilien, som inkluderer steroidhormonreseptorer, tyreoidhormonreseptorer, vitamin D₃ reseptorer og retinsyrereseptorer, samt de reseptorene som enda ikke har noen definert naturlig ligand, "orphan" reseptorer. Det som kjennetegner reseptorfamilien er at de fungerer som ligand-aktiverte transkripsjonsfaktorer [26-28]. Reseptorene regulerer glukose-, lipid- og kolesterolmetabolismen som respons på fettsyrer og deres derivater, eikosanoider og legemidler benyttet i behandling av hyperlipidemi og diabetes [29].

Det er identifisert tre isoformer av PPARs; PPAR α , PPAR δ og PPAR γ , som viser ulik vevsdistribusjon og ligandprioritet. Til tross for disse ulikhetene, deler de samme strukturelle oppbygging [28]. PPAR molekylet består av fire hoveddomener med ulik funksjon, der A/B-domenet er ansvarlig for ligand-uavhengig transkripsjonsregulering. C-domenet interagerer med DNA via peroksisom-proliferator-respons-element (PPRE) sekvensen. Deretter kommer D-domenet som er bindingssete for kofaktorer og som tillater at det siste domenet, E/F, har uavhengige bevegelser. I tillegg er E/F-domenet området for ligandbinding (figur 3) [30, 31].



Ved ligandbinding danner PPARs en funksjonell heterodimer med 9-cis retinsyre reseptor (RXR). Videre interagerer PPAR/RXR-komplekset med spesifikke DNA-sekvenser kalt peroksisom-proliferator-resonselement (PPRE) som finnes på promotorområdet til PPAR-regulerte gener, og transkripsjonen settes i gang [32]. Regulering av gentranskripsjon via ligandbinding til kjernereseptorer involverer spesifikke hjelpeproteiner, såkalte koaktivatorer og korepressorer. Agonist-induserte konformasjonsendringer resulterer i økt assosiasjon med koaktivator og redusert assosiasjon med korepressor [33]. Ved ligandbinding vil korepressoren fortrenses, og reseptoren knytte seg til et koaktivatormolekyl. Dette komplekset vil videre binde seg til PPRE på aktuelt promotorområde og ende i aktivering av spesifikke gener (figur 4). PPAR kan også hemme gentranskripsjonen, men dette skjer vanligvis indirekte, ved at PPAR binder andre transkripsjonsfaktorer, for eksempel NF- κ B [34].



1.5.1 PPAR γ

PPAR γ er i stor grad uttrykt i brunt og hvitt fettvev, men er også tilstede i tarmepitel, retina, skjelettmuskulatur og lymfeorganer. I senere tid er det også sett at PPAR γ er uttrykt i endotelceller og i immunsystemets celler som makrofager, T- og B-celler, samt dendrittceller. Reseptoren har en avgjørende rolle ved differensieringen av fettceller og lipidlagring i hvitt fettvev, samt energifordeling i brunt fettvev [27, 28, 31]. I tillegg er PPAR γ ansvarlig for reguleringen av glukose- og lipidhomeostasen, immunfunksjon, cellevekstregulering, celledifferensiering og induksjon av apoptose i flere maligne cellelinjer [32, 35].

PPAR γ aktiveres av både naturlige og syntetiske ligander. Av naturlige ligander kan 15d-PGJ₂, som er en metabolitt av PGD₂, og lipofile ligander, inkludert langkjedede

flerumettede fettsyrer nevnes. I tillegg til disse er det utviklet flere syntetiske PPAR γ -agonister som tiazolidindioner (TZD), deriblant pioglitazon og rosiglitazon. Det er også vist at NSAIDs, for eksempel indometacin og ibuprofen, kan fungere som PPAR γ -agonister [31].

PPAR γ er overuttrykt i ulike cancertyper som for eksempel bryst- og coloncancer [27, 32, 36], det er sett en signifikant økning av PPAR γ i vev fra tykktarmskreft, sammenlignet med normalt tykktarmsvev fra de samme pasientene [36]. Aktiveringen av reseptoren har vist seg å kunne utøve en rekke antikarsinogene effekter som stimulering av apoptose og hemmet tumorvekst, samt redusert proliferasjon og celledeling [27]. Det er identifisert flere mulige angrepspunkter som kan være av betydning for PPAR γ sine antikarsinogene effekter, deriblant stimulering til økt ekspresjon av PTEN, et tumorsuppressorgen som inaktiverer PI-3K-signalveien, hemmet VEGF- og NF- κ B ekspresjon, hemming av APC/ β -catenin-signalveien [36] og økt ekspresjon av 15-hydroksy-prostaglandin dehydrogenase (15-PGDH), et enzym som inaktiverer PGE₂ [37]. Blant de studiene som er knyttet til PPAR γ og dens rolle ved kreft, foreligger det sprikende resultater, avhengig av om studiene er gjort in vitro eller in vivo. Ved stimulering med PPAR γ -agonister på cellelinjer fra coloncancer in vitro, er det sett en hemmende effekt på tumordannelse. In vivo studier i mus viser derimot at PPAR γ -ligander kan forsterke utviklingen av coloncancer, en effekt som er avhengig av om APC-genet er mutert eller ikke [27]. Choi og medarbeidere viste i tillegg at ligandkonsentrasjonen kan være av vesentlig betydning, da høye konsentrasjoner av PPAR γ -agonist så ut til å undertrykke tumorvekst, mens lave konsentrasjoner fremmet veksten [38].

1.6 Ligander brukt i forsøkene

Rosiglitazon

Rosiglitazon tilhører legemiddelgruppen tiazolidindioner (glitazoner) og har indikasjon diabetes mellitus type 2 [29]. Liganden er en potent og selektiv PPAR γ -aktivator, med høy affinitet til reseptoren [39].

GW9662

GW9662 er beskrevet som en irreversibel, potent og selektiv PPAR γ antagonist [40]. Liganden fungerer imidlertid også som en full antagonist på PPAR δ , og viser partiell agonisme ovenfor PPAR α [41].

Indometacin

Indometacin er et NSAID og klassifiseres som indol-eddiksyrederivat. Liganden er en potent, ikke-selektiv COX-hemmer som hemmer de to COX-enzymene i like stor grad [42]. Det er sett at indometacin reduserer PGE₂-stimulert cAMP-dannelse, samt forårsaker en nedregulering av EP2 reseptorer i coloncancercellelinjen LS174T [43]. Liganden binder seg direkte og spesifikt til PPAR γ , og i høye konsentrasjoner ($\geq 100 \mu\text{M}$ [44]) anses indometacin som en PPAR γ -agonist [45].

Sulindaksulfid

Sulindak er et NSAID som er nært beslektet med indometacin, og tilhører dermed gruppen eddiksyrederivater. Liganden er et prodrug, som utøver det meste av sin farmakologiske effekt ved å reduseres til den aktive metabolitten sulindaksulfid in vivo. Liganden har vist seg å være en effektiv COX-hemmer, med lik affinitet til begge isoformene [42]. Studier på HT29-celler viser at sulindaksulfid forårsaker en reduksjon i proliferasjonshastigheten, samt endrer cellenes morfologi og induserer apoptose. Disse responsene er reversible, samt tids- og konsentrasjonsavhengige [46].

Meklofenamsyre

Meklofenamsyre er et NSAID tilhørende fenamat-familien. Liganden er en ikke-selektiv COX-hemmer, i likhet med de overnevnte NSAIDs [42].

1.7 Hensikt og spesifikke problemstillinger for oppgaven

Hensikten med oppgaven var å studere om NSAIDs utøver noen av sine effekter via PPAR γ , og om reseptoraktivering forekom i konsentrasjoner som er klinisk relevante.

Basert på preliminære data fra tidligere masteroppgave skrevet av Heidi Krogh Andreassen [47], og to publikasjoner hvor den ene tar for seg effekten av indometacin i coloncancer celler [43], og den andre undersøker effekten av PPAR γ -ligander i lungekarsinom celler [48], er hypotesen at PPAR γ -aktivering nedregulerer EP2 reseptornivået. Jeg har derfor undersøkt PGE₂-stimulert cAMP-produksjon og EP2 mRNA ekspresjon i celler forbehandlet med PPAR γ -agonisten rosiglitazon og ulike NSAIDs. Spesifikt har jeg undersøkt følgende problemstillinger:

- Nedreguleres PGE₂-stimulert cAMP-produksjon og EP2 mRNA-ekspresjonen av rosiglitazon og NSAIDs?
- Er dette en effekt knyttet til alle NSAIDs, eller bare visse kjemiske strukturer?
- Er det i tilfelle en PPAR γ -mediert effekt?
- Opptrer disse effektene av NSAIDs ved konsentrasjoner som er klinisk relevante?

2. Materialer og metoder

2.1 Materialer

2.1.1 Kjemikalier

- Coomassie[®] Plus Protein Assay Reagent fra **Interchim (Montlucon, Frankrike)**
- Opti-Fluor[®] fra **PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA, USA)**
- Trietylamin fra **Merck (Hohenbrunn, Tyskland)**
- Eddiksyreanhydrid, meklofenamsyre (natriumsalt), forskolin, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), dimetylsulfoksid (DMSO), merkaptoetanol, adenosine 3',5' cyklisk monofosfat (cAMP), isoprenalin og sulindaksulfid fra **Sigma Chemical CO. (St. Louis, MO, USA)**
- D (+) - Glukose monohydrat, Ammoniumsulfat fra **Merck (Darmstadt, Tyskland)**
- Rosiglitazon og PGE₂ fra **Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA)**
- SeaKem[®] LE Agarose, Nusieve[®] 3:1 Agarose fra **Lonza (Rockland, ME, USA)**
- Hepes fra **Research organics (Cleveland, Ohio, USA)**
- GelRed 10000x fra **Biotium (Hayward, CA, USA)**
- GW9662 fra **Biomol International (Plymouth Meeting, PA, USA)**
- Indometacin: Confortid[®] pulver til injeksjonsvæske ble innkjøpt på Rikshospitalets apotek og løst i den medfølgende ampulle med Aqua ad iniectabilia. Indometacin foreligger som natriumsalt i oppløsningen.

2.1.2 Primere

Primere til kvantitativ PCR-bestemmelse av EP2 mRNA ble designet med programmet Pearl Primer og bestilt fra InVitrogen. Primere til bestemmelse av GAPDH og TaqMan probe var designet med programmet Primer Express.

- EP2 (forward): 5'-GTGTCATTCTCAACCTCATCC-3'
- EP2 (reverse): 5'-AAATCGTGAAAGGCAAGGAG-3'
- GAPDH (forward): 5'-CCAAGGTCATCCATGACAACCTT-3'
- GAPDH (reverse): 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTT-3'
- TaqMan Probe: 5'-CTCATGACCACAGTCCATGCCATCACT-3'

2.1.3 Isotop

- [2,8-³H] adenosine 3',5' cyklisk monofosfat ([³H] cAMP) (38 Ci/mmol) fra **Dupont Nen products (Boston, MA, USA)**

2.1.4 Medium

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) med 1 g/l Glukose, uten glutamin fra **Lonza (Verviers, Belgia)**

2.1.5 Antistoff

- Antistoff mot adenosin 3',5' cyclisk monofosfat (cAMP) var egenprodusert her på **Farmakologisk Institutt i Oslo** [49].

2.1.6 Løsninger

Løsninger til cAMP-assay

Stock-løsninger til Krebs-Ringer løsning A	
NaCl	45 g/L
KCl	5,75 g/100 mL
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	19,1 g/100 mL
KH ₂ PO ₄	10,55 g/100 mL
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	8,08 g/100 mL

Krebs-Ringer løsning A	
NaCl (142 mM)	201,4 mL
KCl (3,53 mM)	5 mL
KH ₂ PO ₄ (2,83 med mer)	4 mL
MgSO ₄ (1,41 mM)	2 mL
CaCl ₂ (2,32 mM)	4,6 mL
H ₂ O	873 mL

Hepes (154 mM), pH = 7,5	
Hepes	18,35 g
H ₂ O	0,5 L

pH justeres med 1M NaOH (ca. 25 mL)

Krebs-Ringer Hepes buffer med glukose	
Krebs-Ringer løsning A	109 mL
Hepes (154 mM)	21 mL
Glukose (15 mM)	0,38 g
pH justeres til 7,4 med NaOH	
Endelig konsentrasjon i Krebs-Hepes buffer blir: NaCl – 119 mM KCl – 2,96 mM KH ₂ PO ₄ – 2,37 mM MgSO ₄ – 1,18 mM CaCl ₂ – 1,95 mM Hepes – 24,9 mM	

Krebs-Ringer Hepes buffer med IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine)

IBMX (2 mM)	13,3 mg
Krebs-Ringer Hepes buffer	30 mL

Acetyleringsreagens

Eddiksyreanhydrid	0,4 mL
Trietylamin	1,0 mL

Mettet ammoniumsulfat (70 %)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	322 g
H ₂ O	Ad 1000 mL

Antistoffbuffer

Bovin serum albumin	0,2 g
Gammaglobulin	0,04 g
Natriumacetat (100 mM), pH 6,2	50 mL
H ₂ O	50 mL

Isotop

[³H] cAMP, 1 mCi/mmol, spesifikk aktivitet 38,0 Ci/mmol, ble fortynnet med 100 mM natriumacetatbuffer, pH = 6,2, til endelig konsentrasjon 3 nM.

PGE₂-løsning (Hormon)

Stock-PGE ₂ (10 ⁻¹ M i etanol)	10 µl
1 % NaHCO ₃	100 µl

Stock-PGE₂ dampes inn under nitrogen og løses i 1 % NaHCO₃, løsningen har konsentrasjonen 10⁻² M og fortynnes videre i to trinn til 10⁻⁴ M i 1 % NaHCO₃.

Bruksferdig PGE₂-løsning

PGE ₂ -løsning (10 ⁻⁴ M)	400 µl
KRH/IBMX	9,6 mL

Endelig konsentrasjon når den er tilsatt i brønnene er 10⁻⁶ M.

Løsninger til gel-elektroforese**50xTAE – buffer, pH = 8.0**

Tris Base	242 g
Iseddik	57,1 mL
0,5 M EDTA (pH = 8.0)	100 mL
H ₂ O	Ad 1000 mL

1xTAE – buffer	
0,04 M Tris/acetat	} 50xTAE – buffer fortynnes 1:50
0,001 M EDTA	
50xTAE – buffer	20 mL
H ₂ O	980 mL

1 % eller 2 % agarosegel	
Agarose	1,5 g (3 g)
1xTAE – buffer	150 mL
GelRed 10000x	15 µl

Det ble utført gelelektroforese både ved RNA-isolering og kvalitativ PCR. De to blandingene er laget på samme måte, men med henholdsvis 1 % og 2 % agarose tilsatt.

TE-buffer (10 mM), pH = 7,4	
1 M Tris-Cl (pH = 7,5)	10 mL
500 mM EDTA (pH = 8,0)	2 mL
H ₂ O	Ad 1000 mL

2.2 Cellelinjene

Det ble hovedsakelig benyttet HT29-celler, med unntak av noen få forsøk, hvor det også ble tatt i bruk HCT116-celler (se 3.5). Begge cellelinjene er isolert fra human coloncancer.

Det er i HT29-cellene sett en mutasjon i tumorsuppressorgenet APC (adenomatøs polyposis coli) som er av vesentlig betydning for kreftutvikling i tykktarmen [38]. Det er sett et høyt uttrykk av PPAR γ i denne cellelinjen [50]. I tillegg viser Banu og medarbeidere at HT29 er en COX-2 positiv cellelinje, med kraftig uttrykk av COX-2 proteiner. Videre fant de at HT29-cellene uttrykker alle de fire EP-reseptorene dog i noe ulik grad, fortrinnsvis mer av EP2- og EP4-reseptorer [51]. Det er gjort lignende forsøk her på laboratoriet, og det ble funnet uttrykk av EP1-, EP2- og EP4-reseptorene i HT29-cellelinjen, men cAMP-produksjonen medieres i hovedsak av EP2 (upubliserte data).

HCT116-cellene viser også høy ekspresjon av PPAR γ , både på mRNA- og protein-nivå [52]. I likhet med HT29-cellene, uttrykker HCT116-cellene også EP-reseptorer, hovedsakelig EP2, men til en viss grad også EP4. I motsetning til HT29-cellene, er dette en COX-2 negativ cellelinje, og den uttrykker dermed ikke COX-2 enzymer [51].

2.3 Celleforsøk

Dyrking og stimulering av celler

Til cAMP-assay ble cellene dyrket med en celletetthet på 50 000 celler/cm² i 6-brønners Costar-brett. Cellene til RNA-isoleringen ble dyrket i Corning-skåler (20 cm²) med samme celletetthet. Felles for begge metodene er at cellene ble sådd ut i medium tilsatt penicillin, streptomycin, glutamin (2 mM) og 10 % hesteserum, og stod i ett døgn ved 37 °C. Deretter ble alle brønnene skylt med 0,9 % NaCl og videre inkubert i serumfritt medium (tilsatt penicillin, streptomycin og glutamin) i enda ett døgn. Til slutt ble cellene stimulert i serumfritt medium med følgende ligander i ulike konsentrasjoner for cAMP-assay og i én konsentrasjon for RNA-isolering (oppgitt i parentes); rosiglitazon (10⁻⁵ M), GW9662, indometacin (100 µM), sulindaksulfid (10 µM) og meklofenamsyre (100 µM), og inkubert i minst 20 timer.

2.3.1 cAMP-assay

Prinsipp for analysen

Ved hjelp av en standardkurve med kjent konsentrasjon av cAMP, kan den ukjente cAMP konsentrasjonen i celleprøvene bestemmes. Både standarder og prøver tilsettes isotop ([³H] cAMP) i kjent konsentrasjon, og etter at antistoff er tilsatt oppstår det en konkurranse mellom cAMP og isotop om høyest antistoffbinding. Ved å tilsette mettet ammoniumsulfat oppstår det en utfelling av cAMP/antistoff, og all ubundet cAMP fjernes ved sentrifugering. Radioaktiviteten måles ved hjelp av en scintillasjonsteller og resultatet vil kunne fastslå cAMP konsentrasjonen i celleprøvene ved avlesning fra standardkurven. Deteksjonen måles i desintegrasjoner per minutt (DPM). Et høyt antall DPM betyr høy radioaktivitet og høy binding av [³H] cAMP, som sammen gir uttrykk for at prøvene har lav konsentrasjon av umerket cAMP. Ved økende konsentrasjon av

cAMP i prøvene, konkurreres radioliganden ut, og mengde radioaktivitet bundet til antistoff synker.

Preparering av prøver

Hver brønn ble tilsatt 1,5 ml Krebs-Ringer-Hepes (KRH) buffer etter at mediet var fjernet. Deretter ble cellebrettene satt til preinkubering i 15 minutter ved 37 °C. Videre ble 500 µl PGE₂ (hormon) løst i KRH-buffer/IBMX, endelig konsentrasjon 1 µM, og 500 µl KRH-buffer/IBMX, brukt som kontroll, tilsatt etter eget skjema. Etter fem minutters inkubasjon ble reaksjonen stoppet ved at bufferen ble pipettert bort og hver brønn tilsatt 600 µl kald 5 % TCA. Brønnene ble skrapet med en rubber-policeman og cellene overført til koniske glassrør ved hjelp av en glasspipette. Rørene ble sentrifugert ved 2400 rpm i 10 minutter ved 4 °C, og supernatanten overført til matte TT-rør. Prøvene ble frosset ved – 20 °C til analysen skulle utføres.

Analyse av prøvene

Analysen ble utført som beskrevet av Skomedal og medarbeidere [49]. Først ble det laget en standardkurve hvor cAMP ble fortynnet med 5 % TCA til følgende konsentrasjoner: 0 – 1,25 – 2,5 – 5 – 10 – 20 – 40 – 80 – 160 nM. I tillegg ble det laget en blankprøve som kun bestod av 5 % TCA. 250 µl av hver celleprøve ble overført til små glassrør, og sammen med hver standardløsning ble alle rørene tilsatt én spatelspiss CaCO₃, dette for å nøytralisere prøvene. Rørene ble ristet på en Whirlmixer før sentrifugering ved 2000 rpm i 10 minutter ved 4 °C. Videre arbeid med prøvene ble utført på is. To paralleller bestående av 50 µl av hver celleprøve ble overført til Nunc-rør, uten at noe CaCO₃ ble tatt med, og tilsatt 50 µl med isotopen [³H] cAMP. Deretter ble det laget et acetyleringsreagens og 5 µl av dette ble tilsatt alle rør som umiddelbart ble ristet på Whirlmixer. Videre ble 100 µl antistoff (fortynnet med antistoff-buffer til 1:2000) tilsatt alle rør, med unntak av de to merket med ”blank”, som i stedet ble tilsatt

100 µl antistoff-buffer. Rørene ble ristet på Whirlmixer før de ble satt til inkubasjon ved 4 °C til neste dag. Dagen etter ble rørene tilsatt 1 ml 70 % mettet ammoniumsulfat, dette for å felle proteinet, og sentrifugert ved 5000 rpm i 30 minutter ved 4 °C. Videre ble supernatanten helt av og rørene satt på hodet over Linella-papir i ca. 10 minutter. Helt til slutt ble 100 µl destillert vann og 2 ml telleveske (OptiFluor®) tilsatt alle rør. I tillegg til disse rørene ble det laget to paralleller merket "standard", bestående av 50 µl isotop og 2 ml telleveske, dette som en kontroll på mengde radioaktivitet tilsatt til hver prøve. Rørene ble korket og ristet på Whirlmixer før analysering i scintillasjonstelleren.

2.3.2 Proteinmåling

For å måle den ukjente proteinkonsentrasjonen i celleprøvene ble det brukt Coomassie® Plus Protein Assay Reagent Kit. Når Coomassie® bindes til protein i surt miljø får man et umiddelbart absorbansskifte, fra 465 nm til 595 nm.

Det ble utført proteinmåling på celleprøver fra proteinbrett, der det var nok celler til ekstra brett for proteinmåling, eller på pelleten fra cAMP-analysen, hvis det ikke var nok celler til ekstra brett. Før selve proteinmålingen kunne utføres, måtte celleprøvene prepareres. Proteinbrettet ble tatt ut av fryseren og hver brønn tilsatt en bestemt mengde 0,08 M NaOH (500-1000 µl). Etter inkubasjon ved 37 °C i tre timer, ble innholdet i brønnene overført til matte TT-rør. Pelleten fra cAMP-analysen ble løst i 500 µl 0,08 M NaOH under risting på Whirlmixer og overført til matte TT-rør. Helt til slutt ble prøvene satt i kjøleskap til proteinmålingen skulle foretas.

Først ble det laget en standardkurve hvor en stock av bovin serumalbumin (BSA) ble fortynnet med 0,08 M NaOH til følgende konsentrasjoner: 0 – 0,025 – 0,05 – 0,1 – 0,

25 – 0,5 – 0,75 – 1 mg/ml. Videre ble det benyttet en 96-brønners plate, og 10 µl av hver standard og ukjent prøve ble tilsatt i hver sine brønner, i tre paralleller. Helt til slutt ble 300 µl Coomassie[®] proteinreagens tilsatt hver brønn og absorbansen ble avlest i en EnVision[®] 2104 Multilabel Reader.

2.3.3 RNA-isolering

Prinsipp for analysen

Hovedmålet med RNA-isolering er å separere RNA fra proteiner, noe som er oppnåelig på grunn av deres ulike kjemiske egenskaper. Sammenlignet med proteiner som er hydrofobe, er RNA-molekyler mer hydrofile grunnet deres ladde fosfatrygg. RNA-isoleringen ble utført ved å bruke et RNeasy minikit fra Quiagen. Dette er i følge produsenten egnet til å isolere total RNA fra små mengder startmateriale. Prøvene lyseres og homogeniseres i nærvær av en denaturerende buffer, som umiddelbart inaktiverer RNaser og sikrer at intakt RNA isoleres. Ved å tilsette etanol til lysatet vil både RNA og DNA felle ut. Prøvene appliseres på RNeasy minikolonner hvor RNA og DNA bindes. Det utføres en DNasebehandling på filteret og forurensninger blir fjernet ved vasking. Deretter blir RNA eluert.

For å unngå å kontaminere prøvene med DNA, eller tilføre dem eksogent RNase, ble det under hele prosedyren benyttet hansker. I tillegg var alt utstyr og reagenser RNase fritt og behandlet med kjemikalier som inaktiverer tilstedeværende RNase.

Høsting av celler

Mediet i skålene ble fjernet og det ble skylt med RNase-fritt saltvann. Deretter ble hver skål tilsatt 350 µl RLT lysis-buffer som var tilsatt 10 µl/ml merkaptoetanol. Skålene ble skrapet med en cell-lifter og innholdet overført til eppendorf-rør og dratt opp og ned med sprøyte tre-fire ganger.

Isolering av RNA fra prøvene

Til 350 µl lysat ble det tilsatt 350 µl 70 % etanol og blandet forsiktig med pipette. Blandingen ble applisert på søyler og sentrifugert i 15 sekunder ved 13 000 rpm. Eluatet ble kastet, før 350 µl buffer RW1 ble pipettert på kolonnen. Prøvene ble igjen sentrifugert i 15 sekunder ved 13 000 rpm, og eluatet kastet. Videre ble 80 µl DNase i buffer RDD per prøve tilsatt membranen, og dette fikk stå i romtemperatur i 15 minutter. Nye 350 µl buffer RW1 ble tilsatt søylene, som ble sentrifugert ved 13 000 rpm i 15 sekunder. Eluatet ble igjen kastet og søylene overført til nye oppsamlingsrør. Videre ble søylene vasket to ganger med 500 µl buffer RPE og sentrifugert ved 13 000 rpm i henholdsvis 15 sekund og to minutter. Mellom hver skylling ble eluatet kastet, og etter siste skylling ble søylene overført til eppendorf-rør. Helt til slutt ble 40 µl RNase-fritt vann tilsatt og prøvene eluert ved sentrifugering i ett minutt ved 13 000 rpm.

Måling av OD

Den endelige RNA-konsentrasjonen ble bestemt spektrofotometrisk ved å måle absorbansen ved 260 nm (A_{260}). 5 µl av hver prøve ble overført til nytt eppendorf-rør og tilsatt 95 µl 10 mM TE-buffer. I tillegg til prøvene, ble det også benyttet en blankprøve bestående av ren TE-buffer. Rørene ble ristet på vortex før de gjennomgikk en rask sentrifugering. Hele innholdet (100 µl) ble overført til en kuvette og absorbansen ble målt i et spektrofotometer (Ultrospec 2100 pro).

Gelstøping

Det ble laget 1 % agarosegel. Agarose og 1xTAE-buffer ble varmet opp til oppkok, slik at agarosen smeltet. Alle partiklene må være borte, da tilstedeværende partikler vil kunne påvirke vandringen på gelen. Blandingen ble avkjølt før GelRed 10000x (5 µl per 50 mL) ble tilsatt. Den ferdige blandingen ble helt over ferdig oppsatt stativ med brønnekammer, og satt for å stivne. Da gelen var ferdig stivnet ble brønnekammene fjernet og platen med gel satt i elektroforesekarret.

Gelelektroforese

Det ble kjørt gelelektroforese for å få en bekreftelse på RNA kvaliteten. Ved nøytral pH er RNA negativt ladd, og vil bevege seg mot den positive polen når spenning tilføres. Til 5 µl RNA (1 µg, beregnet ut i fra verdiene fra OD-måling, fortynnet med nukleasefritt vann) ble det tilsatt 2 µl formamid. Blandingen ble varmet opp til 65 °C i 10 minutter og avkjølt på is, før hver prøve ble tilsatt 2 µl loading buffer. Hele volumet (9 µl) av hver prøve ble applisert på gelen og kjørt ved 50 V i ca. 60 minutter. RNA båndene i gelen vil farges av GelRed 10000x. Dersom RNA er intakt og av god kvalitet vil 18S og 28S RNA foreligge som to separate og intakte bånd når gelen gjennomlyses med ultrafiolett (UV) lys.

2.3.4 Kvalitativ PCR (gel)

Prinsipp for analysen

PCR er en metode som brukes for å lage flere kopier av bestemte DNA-sekvenser. Før dette kan skje, må RNA omdannes til cDNA (følgende avsnitt). Metoden er basert på bruken av DNA polymerase som vil kopiere en bestemt DNA-sekvens i gjentatte replikasjonssykluser. DNA består av to tråder med basepar som er komplementære

med hverandre. Det vil si at en sekvens i den ene tråden har en "negativ" motsats i den andre. Den doble DNA-tråden denatureres og splittes til to enkelttråder. Dermed er det mulig å få tak i sekvensen som normalt ligger skjult inne i dobbeltråden. Primere tilsatt i reaksjonsblandingen binder seg til ønsket sekvens i DNA. Videre blir sekvensen kopiert av tilsatt enzym, før DNA denatureres igjen. Det hele foregår i en PCR-maskin, som justerer temperaturen ut i fra et forhåndsvalgt program. Først vil dobbeltrådet DNA separeres, og ved oppvarming til 94 °C splittes dobbelhelixen og DNA "smeltes" til enkelttrådet DNA. I neste trinn senkes temperaturen til like under primernes smeltepunkt, ca. 53-60 °C, dette skaper optimale bindingsforhold for primerne. Til slutt økes temperaturen igjen, vanligvis til 68-72 °C, slik at polymerasen kan replikere ønsket DNA-sekvens. Disse syklusene gjentas minst 40 ganger for at ønsket mengde kopier av DNA-fragmenter skal nås.

Syntese av cDNA med revers transkriptase

Hele prosessen foregår på is og med hansker.

Enkelttrådet mRNA er ustabilt og dermed uegnet som utgangsmaterialet til PCR-reaksjonen. Hensikten med cDNA syntesen er å omdanne mRNA til cDNA, som er mer stabilt. Basert på OD-målingene tilsettes hvert rør 5 µg RNA og RNasefritt vann, til et total volum på 11 µl. Videre tilsettes rørene 1 µl dNTP mix og 1 µl oligo dT, før de inkuberes ved 65 °C i fem minutter i en PCR-maskin. Prøvene avkjøles på is og sentrifugeres, før videre bearbeiding. En reaksjonsmix bestående av 4 µl 5X First strand buffer, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNaseOUT og 1 µl SuperScript III (enzym) per prøve lages, og 7 µl av denne tilsettes hvert rør. Innholdet blandes forsiktig og sentrifugeres før rørene igjen inkuberes i PCR-maskinen ved følgende program:

25 °C	5 minutter
50 °C	60 minutter
70 °C	15 minutter
4 °C	- slutt

Reaksjoner uten revers transkriptase ble kjørt parallelt som kontroll på kontaminasjon med genomisk DNA, og i PCR reaksjonen fungerte de som negativ kontroll. I disse rørene ble RNaseOUT og SuperScript III erstattet med RNasefritt vann. RNA er nå omdannet til cDNA, og PCR-reaksjonen kan utføres.

PCR-reaksjonen

En reaksjonsblanding lages og består av følgende per prøve; 5 µl 10X PCR-buffer, 3 µl 25 milliM MgCl₂, 1 µl 10 milliM dNTP mix, 2 µl cDNA, 0,25 µl AmpliTaq (enzym) og 36,75 µl nukleasefritt vann. Sammen med 1 µl sense og 1 µl antisense primere, tilsettes 48 µl av reaksjonsblandingen hvert prøverør, blandes forsiktig og sentrifugeres. Rørene plasseres i PCR-maskinen ved følgende program:

94 °C	5 minutter
94 °C	30 sekunder
60 °C	30 sekunder
72 °C	1 minutt
72 °C	10 minutter
4 °C	- slutt



Gjentas 40 ganger

Gelstøping

Dette gjøres mens PCR-reaksjonen utføres. Det er benyttet samme fremgangsmåte som for gelstøping til RNA-isolering (se 2.3.3). Forskjellen er at det ved PCR ble laget en 2 % agarosegel, med en annen type agarose som er bedre egnet ved separering av fragmenter av mindre størrelser.

Gelelektroforese

20 µl av hver prøve fra PCR-reaksjonen blandes med 5 µl loadingbuffer (5xOrange), og hele volumet (25 µl) appliseres på gelen. I tillegg tilsettes én av brønnene 5 µl 100 bp ladder (som er en blanding av DNA-fragmenter med kjent størrelse). Ved å tilsette ladder ser man om det syntetiserte DNA har riktig størrelse. Elektroforesen ble kjørt ved 100 mV i ca. 60 minutter.

2.3.5 Kvantitativ PCR

Prinsipp for analysen

Hensikten med kvantitativ RT-PCR, er å identifisere og samtidig mengdebestemme reaksjonsprodukter som dannes i løpet av hver syklus, og all data samles under PCR prosessen. I denne oppgaven ble det brukt både SYBR[®] Green og Taqman probe til deteksjon av PCR-produkt. SYBR[®] Green er et fluorescerende fargestoff som i ubunden form utviser lite fluorescens. Etter hvert som polymeriseringstrinnet forløper, vil flere fargemolekyler binde seg til nysyntetisert DNA, og dette komplekset vil gi økt fluorescenssignal som detekteres i PCR-maskinen. Et negativt aspekt ved bruk av SYBR[®] Green, er at det binder seg til ethvert dobbelttrådet DNA tilstede, inkludert primer-dimere og andre ikke-spesifikke reaksjonsprodukter, noe som kan føre til en overestimering av targetkonsentrasjonen [53, 54]. Probe-basert RT-PCR skiller mellom

spesifikk og ikke-spesifikk amplifikasjon. Taqman probe som er en kort enkelttrådet oligonukleotidesevens, komplementær til en av DNA trådene i PCR-produktet (amplicon), ble brukt for kvantifisering av kontrollgenet glyceraldehyd-3-fosfat-dehydrogenase (GAPDH).

Terskelnivået C_t defineres som antall sykluser av PCR-reaksjonen som må til før fluorescensen i en prøve har nådd en terskelverdi. Desto mer templat som er tilstede i begynnelsen av reaksjonen, desto færre sykluser er nødvendig før det lages tilstrekkelige mengder av ønsket PCR-produkt [54]. En standardkurve med økende konsentrasjon av RNA ble kjørt parallelt i PCR-prosessen, dette for å bekrefte at revers transkripsjon av mRNA til cDNA er lineær. Standardkurven ble også benyttet til å beregne mengde PCR-produkt.

Ved å gjennomføre en smeltepunktsanalyse, vil man få en bekreftelse på produktidentitet og det er mulig å skille mellom spesifikke og ikke-spesifikke produkter. Temperaturen økes sakte til T_m for det ønskede PCR-produktet nås, og fluorescensen måles. Da smeltetemperaturen for PCR-produktet (amplicon) er fullstendig avhengig av dets nukleotidsammensetning, er det mulig å identifisere signalet fra det ønskelige produktet. [54].

For å veie opp mot eventuelle skjevheter som kan ha oppstått i løpet av prøveopparbeidelsen, som ulik mengde templattilsetning, variasjoner i effektiviteten av RT-PCR mellom prøvene og for feil i kvantifiseringen av prøvene, blir ekspresjonsnivået av hvert analyserte gen normalisert opp mot "husholdningsgener", som i dette tilfellet var GAPDH. Dette genet skal vise minimal variasjon i ekspresjonen mellom ulike vev i en organisme og skal normalt ikke påvirkes av eksperimentell behandling.

cDNA syntese med Invitrogen SuperScript III First strand synthesis supermix for qRT-PCR

For hver prøve tilsettes følgende: 20 µl 2xRT reaksjonsmix, 4 µl RT enzym-mix, RNA tilsvarende 1 µg (beregnet ut i fra OD-målingene) og DEPC-vann ad 40 µl. I rørene uten revers transkriptase erstattes RT enzym-mix med DEPC-vann. I tillegg lages to standardkurver, hvor den ene fortynnes før revers transkriptase (RT) reaksjonen, og den andre etterpå. Begge standardkurvene lages som en blanding av flere prøver;

1. Standard 1 (fortynning før RT): 2-1-0,5-0,25-0,125 µg RNA per rør.
2. Standard 2 (fortynning etter RT): 5 rør à 1 µg RNA.

Rørene blandes forsiktig og sentrifugeres før de settes i PCR-maskin med følgende inkuberingsbetingelser:

25 °C	10 minutter
50 °C	30 minutter
85 °C	5 minutter
4 °C	Avkjøling

Etter avkjøling, ble 2 µl E. coli RNase H tilsatt hvert rør, og prøvene igjen inkubert i PCR-maskinen ved 37 °C i 20 minutter og avkjølt til 4 °C. Etter RT-reaksjonen ble rørene til standardkurve 2 blandet og videre fortynnet på følgende måte (tilsvarer fortynning A);

2 µg: 40 µl prøve + 20 µl vann

1 µg: 20 µl prøve + 40 µl vann

0,5 µg: 10 µl prøve + 50 µl vann

0,25 µg: 5 µl prøve + 55 µl vann

0,125 µg: 2,5 µl prøve + 57,5 µl vann

Helt til slutt ble det laget to fortynninger av prøvene, for videre bruk ved kvantitativ RT-PCR.

Fortynning A: Alle prøvene (med og uten revers transkriptase) og standard 1 ble fortynnet i forholdet 20 µl prøve + 40 µl vann.

Fortynning B: Kun prøver med revers transkriptase og begge standardkurvene ble fortynnet i forholdet 5 µl fortynning A + 300 µl vann.

Preparering av prøvene

Det ble totalt laget tre 96-brønners brett;

1. EP2 – Med SYBR[®] Green, et fluorescerende fargestoff.
2. EP2 – prøver uten RT. Med SYBR[®] Green
3. GAPDH – Med TaqMan probe.

Til brettene med EP2 ble det brukt *fortynning A* prøver. For hver prøve (både med og uten revers transkriptase), standard og 2 x bakgrunn (kun vann) ble det kjørt med tre paralleller, og det ble pipettert ut 27 µl cDNA per rør. Deretter ble det laget en reaksjonsmix, og for hver prøve tilsettes: 0,5 µl forward primer (10 µM) og 0,5 µl reverse primer (10 µM), 12,5 µl SYBR[®] Green reaksjonsblanding og 2,5 µl vann. 48 µl av denne blandingen ble pipettert ut til hvert rør, som på forhånd inneholdt cDNA, det hele ble blandet forsiktig og til slutt ble 24 µl av blandingen tilsatt i hver brønn.

Til brettet med GAPDH ble det brukt *fortynning B* prøver. Her ble det kun brukt prøver med revers transkriptase, standard og 2 x bakgrunn. Igjen ble det kjørt med tre paralleller, og det ble pipettert ut 9 µl cDNA per rør. Reaksjonsblandingen som ble laget bestod for hver prøve av 12,5 µl reaksjonsmix, 0,5 µl forward primer (10 µM) og 0,5 µl revers primer (10 µM), 0,25 µl TaqMan probe (5 µM) og 8,25 µl vann. 66 µl av

blandingen ble pipettert ut til hvert rør og blandet forsiktig med allerede tilsatt cDNA, før 24 µl av reaksjonsblandingen ble tilsatt i hver brønn.

Brettene ble i tur og orden satt i en PCR-maskin (ABI Prism 7900HT Sequence Detection System, Applied Biosystems). Hvert brett stod i ca. 2-2 ½ time ved følgende PCR-betingelser:

50 °C	2 minutter	} 40 sykluser
95 °C	10 minutter	
95 °C	15 sekunder	
60 °C	60 sekunder	
95 °C	15 sekunder	

Ved SYBR[®] Green analysen, ble det i tillegg kjørt et dissosiasjonstrinn. Spesifisiteten av RT-PCR produktene ble bekreftet ved en smeltepunktsanalyse, som viser kun én topp dersom det er spesifikke produkter tilstede.

Analyse av kvantitative RT-PCR data

Et amplifikasjonsplot ble laget for hvert forsøk ved hjelp av ”Sequence Detector Software” (SDS versjon 2.2, Applied Biosystems). Plotet viser en økning av fargefluorescens i hver PCR syklus. En C_t -verdi for hver syklus ble automatisk beregnet, og denne verdien forteller ved hvilken PCR syklus fluorescensen først detekteres over bakgrunnen. Den oppnås i den lineære fasen av PCR, hvor det ikke er tilstedeværelse av hastighetsbestemmende komponenter [54].

Standardkurver for hvert sett av primer/probe ble laget ved å plote C_t -verdiene mot $\log [\text{total RNA}]_{\text{start}}$ (likning 1), og resultatet blir en rett linje. Stigningstallet (a) beskriver effektiviteten av PCR-reaksjonen, og dersom PCR amplifikasjonen er optimal vil stigningstallet være -3,3, ettersom 3,3 sykluser er nødvendig for å oppnå en 10-gangers økning av produktmengden [54].

$$(1) \quad C_t = a * (\log Q) + b$$

C_t er terskelnivået, a er stigningstallet, Q er antall kopier i begynnelsen og b er skjæringspunktet ved y-aksen.

I tillegg kommer det automatisk ut en korrelasjonskoeffisient som forteller hvor god standardkurven er. Verdien ligger mellom 0 og 1, og det er ønskelig at den er så nær 1 som mulig.

Beregninger og statistisk analyse

Hvert forsøk ble gjentatt minst tre ganger (hvis ikke annet er oppgitt i teksten).

Resultatet av cAMP-analysen ble kalkulert ut i fra tre paralleller av kontroll og av hver konsentrasjon av ligand. Videre ble det beregnet et gjennomsnitt av de tre parallellene, før alle forsøkene ble slått sammen. De sammenslåtte resultatene ble analysert for statistisk signifikans ved hjelp av en enveis variansanalyse (ANOVA) med Bonferroni-korreksjon for parvis sammenligning. Det var da mulig å se om ligandene utøvte en signifikant dose-avhengig effekt, og eventuelt ved hvilke konsentrasjoner det var en signifikant forskjell fra kontrollen. Forskjellene ble betraktet som statistisk signifikante dersom $p < 0,05$. Resultatet er uttrykt som gjennomsnitt \pm SEM.

I forsøkene hvor det ble sett på effekten av rosiglitazon (10 μ M) på PGE₂-, forskolin- og isoprenalin-stimulert cAMP-produksjon, ble de sammenslåtte resultatene analysert for statistisk signifikans ved en parret t-test. Det var dermed mulig å se om det var signifikant forskjell i mengde cAMP-produksjon i cellene forbehandlet med medium sammenlignet med cellene som ble forbehandlet med rosiglitazon (10 μ M) før stimulering.

For kvantitativ RT-PCR-forsøkene ble hver prøve kjørt i triplikater, og gjennomsnittsverdien av disse ble brukt til beregning av ratio mellom EP2 mRNA i prøvene og normaliseringsgenet GAPDH. Resultatet er uttrykt som gjennomsnitt \pm SEM. De sammenslåtte resultatene ble analysert for statistisk signifikans ved hjelp av en enveis variansanalyse (ANOVA) med Bonferroni-korreksjon for parvis sammenligning.

Både utarbeidelse av grafer og statistiske beregninger er utført i dataprogrammet GraphPad Prism 5.

3. Resultater

3.1 Ett døgn serumfritt vs. to døgn serumfritt

I tidligere forsøk [47] ble HT29-cellene dyrket ett døgn serumfritt og deretter ett døgn serumfritt med ulike NSAIDs eller rosiglitazon. Siden cellene trives dårligere under serumfrie betingelser, gikk de første forsøkene i denne oppgaven ut på å undersøke om samme effekt kunne oppnås ved å tilsette rosiglitazon/NSAIDs samtidig som det ble byttet til serumfritt medium. Cellene ble i begge tilfeller forbehandlet med rosiglitazon i konsentrasjonene 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} og 10^{-5} M, og deretter stimulert med PGE_2 .

Det var stor spredning mellom forsøkene, og resultatene var ikke statistisk signifikante, verken for cellene som stod ett døgn eller to døgn serumfritt. Etter to døgn var det likevel en tydelig doseavhengig effekt av rosiglitazon, selv om den ikke var signifikant, mens det etter ett døgn ikke var noen klar doseavhengighet (data ikke vist). Som følge av disse resultatene ble det besluttet at det i fortsettelsen av prosjektet skulle holdes fast ved tidligere protokoll: Ett døgn serumfritt fulgt av ett døgn serumfritt med tilsetning av aktuelle ligander.

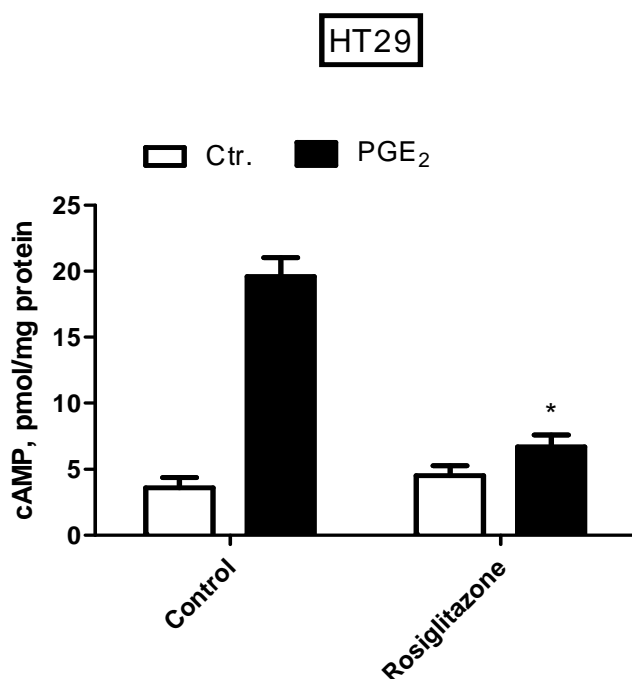
3.2 Effekt av rosiglitazon i HT29-celler

3.2.1 Stimulering av cellene med PGE_2

HT29-cellene uttrykker EP-reseptorer, hovedsakelig EP2 og EP4. Aktivisering av EP2- og EP4-reseptorene gir et økt nivå av cAMP i cellene via kobling til G_s protein og en stimulering av adenylyl cyklase (AC) [51]. Videre er det i laboratoriet funnet at cAMP-

responsen i hovedsak medieres av EP2-reseptorene i disse cellene (Sandnes, upubliserte data). Rosiglitazon er en PPAR γ -agonist, og det er i humane lungekreftceller dokumentert at denne liganden hemmer celleveksten ved å redusere EP2-uttrykket [48]. Cellene ble forbehandlet med 10 μ M rosiglitazon, og det ble undersøkt om det oppstod en reduksjon i PGE $_2$ -stimulert cAMP-produksjon. Cellene ble stimulert med 1 μ M PGE $_2$ i fem minutter i nærvær av fosfodiesterasehemmeren IBMX før reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 5 % TCA.

Som figur 5 viser, er det liten spredning i resultatene mellom forsøkene. Resultatene viser at forbehandling av cellene med rosiglitazon i 20 timer gav en redusert PGE $_2$ -stimulert cAMP-produksjon. Ved hjelp av en paret t-test, fant vi at det er en signifikant forskjell ($p < 0,0001$) på cAMP-produksjon mellom kontrollene og celler forbehandlet med rosiglitazon. Rosiglitazon utøver dermed effekt på PGE $_2$ -responsen. Dette stemmer overens med tidligere studier i form av fulle dose-responskurver med PGE $_2$ her på laboratoriet [47].

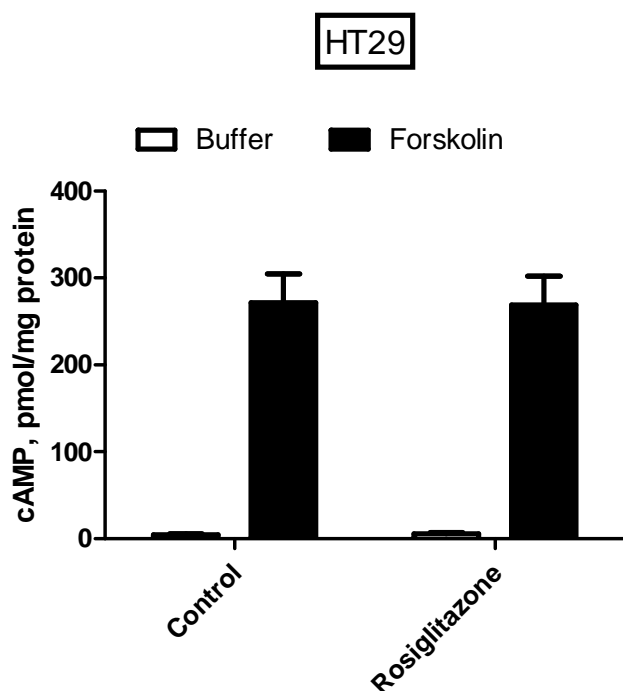


Figur 5: Effekt av rosiglitazon på PGE $_2$ -stimulert cAMP-produksjon. Med en celledetthet på 50 000 celler/cm 2 , stod cellene i serumholdig medium (10 % serum) i ett døgn. Deretter ble det byttet til serumfritt medium og cellene ble inkubert i ett døgn til. Videre ble cellene forbehandlet med rosiglitazon (10 μ M) eller bare serumfritt medium og inkubert i 20 timer. Cellene ble høstet, stimulert med 1 μ M PGE $_2$ i nærvær av 0,5 mM IBMX i 5 minutter, før cAMP-assay ble gjennomført som beskrevet i metodedelen. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM av seks uavhengige forsøk

3.2.2 Stimulering av cellene med forskolin

For å undersøke om effekten av rosiglitazon var spesifikk for EP2-responsen, ble det benyttet forskolin. Forskolin er et diterpen som er isolert fra røttene til den indiske planten *Coleus forskohlii*. Liganden er en direkte aktivator av adenylyl cyklase (AC), som hovedsakelig aktiverer den katalytiske enheten til enzymkomplekset, men også til en viss grad det stimulerende G-proteinet (G_s) [55, 56]. Cellene ble stimulert med 10 μ M forskolin i nærvær av IBMX i fem minutter før reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 5 % TCA.

Forbehandling med rosiglitazon gav ingen endring i forskolin-stimulert cAMP-produksjon (figur 6). t-testen ($p=0,9128$) viser at det ikke er signifikant forskjell mellom kontrollceller og celler forbehandlet med rosiglitazon med hensyn på cAMP-produksjonen. Rosiglitazon utøver ingen effekt på forskolin-responsen.

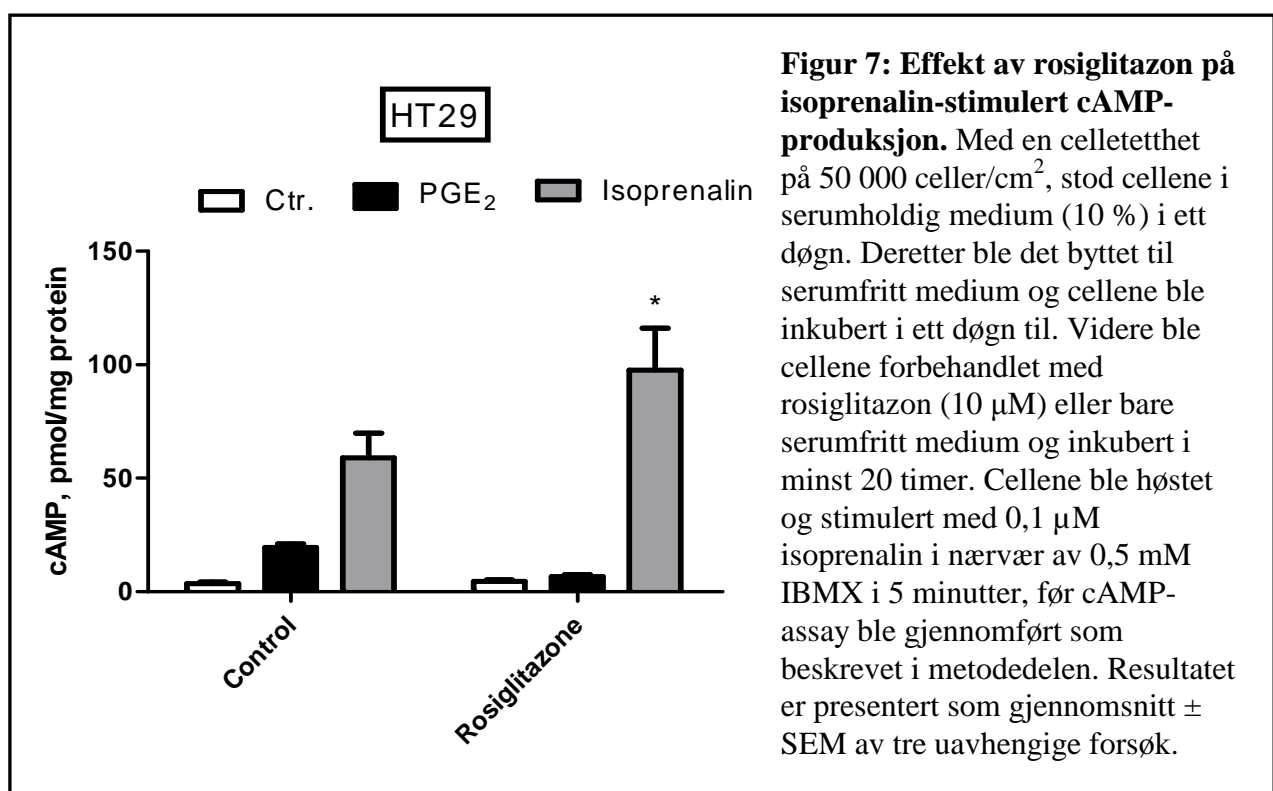


Figur 6: Effekt av rosiglitazon på forskolin-stimulert cAMP-produksjon. Med en celletetthet på 50 000 celler/cm², stod cellene i serumholdig medium (10 %) i ett døgn. Deretter ble det byttet til serumfritt medium og cellene ble inkubert i et døgn til. Videre ble cellene forbehandlet med rosiglitazon 10 μ M eller bare serumfritt medium og inkubert i minst 20 timer. Cellene ble høstet og stimulert med 10 μ M forskolin i nærvær av 0,5 mM IBMX i 5 minutter, før cAMP-assay ble gjennomført som beskrevet i metod delen. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM av seks uavhengige forsøk.

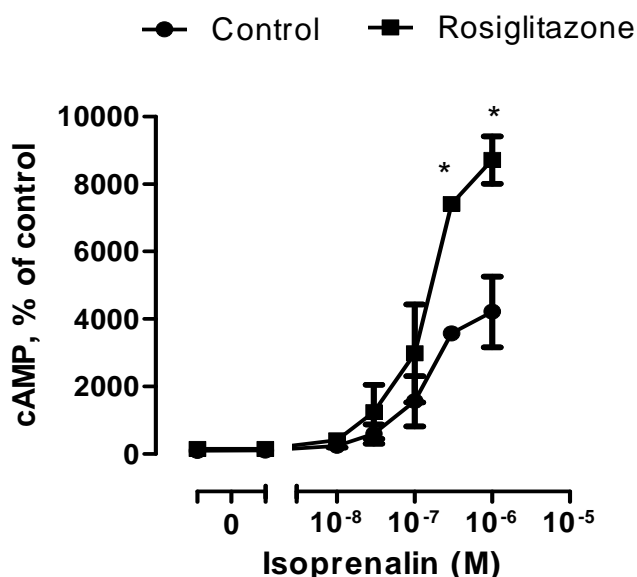
3.2.3 Stimulering av cellene med isoprenalin

For ytterligere å undersøke om effekten av rosiglitazon var spesifikk for EP2-responsen, undersøkte jeg også isoprenalin-stimulert cAMP-akkumulering etter forbehandling med rosiglitazon. Det er tidligere vist at HT29-celler har isoprenalin-stimulert cAMP respons [57]. Isoprenalin er en potent, ikke-selektiv β -adrenerg agonist, med lik affinitet til β_1 -og β_2 -reseptorene. β -adrenerge reseptorer tilhører familien G_s -proteinkoblede reseptorer (GPCR) [58]. I tillegg til at HT29-cellene uttrykker EP2- og EP4-reseptorer, er det funnet mRNA uttrykk av både β_1 - og β_2 -adrenerge reseptorer i samme cellelinje. Ved bruk av RT-PCR ble det sett et svakt uttrykk av β_1 -adrenerge reseptorer, i motsetning til et sterkt uttrykk av β_2 -adrenerge reseptorer [59]. Cellene ble stimulert med 0,1 μ M isoprenalin i nærvær av IBMX i fem minutter før reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 5 % TCA.

Som figur 7 viser, er det en økning i mengde isoprenalin-stimulert cAMP etter forbehandling med rosiglitazon. Ved hjelp av en paret t-test, fant vi at det er en signifikant forskjell ($p=0,0368$) på cAMP-produksjon mellom kontrollcellene og celler forbehandlet med rosiglitazon. Dette var et uventet funn, men resultatet tyder i hvert fall på at effekten av rosiglitazon på PGE₂-stimulert cAMP-akkumulering ikke er en uspesifikk effekt.



For å bekrefte at rosiglitazon 10 μ M har en effekt på isoprenalin-stimulert cAMP-produksjon ble det utført cAMP-bestemmelse med fulle dose-responskurver av isoprenalin. Det ble brukt følgende konsentrasjoner av isoprenalin; 10^{-9} , 10^{-8} , $3 \cdot 10^{-8}$, 10^{-7} , $3 \cdot 10^{-7}$ og 10^{-6} M. Tre uavhengige forsøk ble utført, og resultatet er presentert som prosentandel av kontroll. Enveis ANOVA viste at resultatet var signifikant ($p < 0,0001$), og videre parvis sammenligning viste at resultatet var signifikant forskjellig fra kontrollen ved $3 \cdot 10^{-7}$ og 10^{-6} (*). Figur 8 viser at forbehandling med rosiglitazon øker isoprenalin-stimulert cAMP-akkumulering sammenlignet med kontrollen.



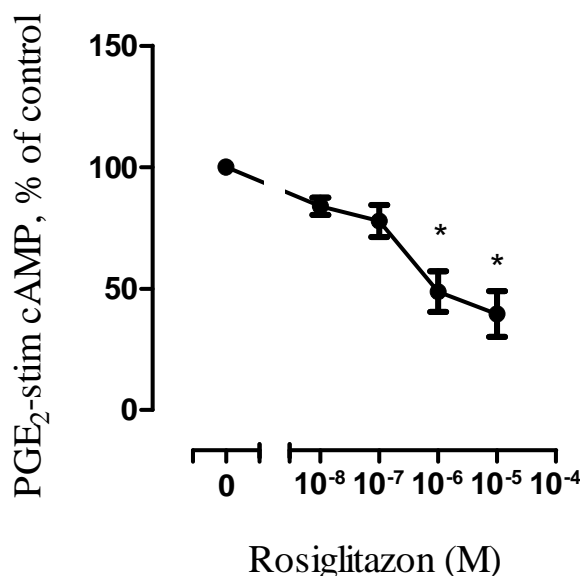
Figur 8: Effekt av rosiglitazon på isoprenalin-stimulert cAMP-produksjon. Med en celledetthet på 50 000 celler/ cm^2 , stod cellene i serumholdig medium (10 %) i ett døgn. Deretter ble det byttet til serumfritt medium og cellene ble inkubert i ett døgn til. Videre ble cellene forbehandlet med rosiglitazon (10 μ M) eller bare medium (serumfritt), og inkubert i minst 20 timer, før cellene ble stimulert med økende konsentrasjon (10^{-9} , 10^{-8} , $3 \cdot 10^{-8}$, 10^{-7} , $3 \cdot 10^{-7}$ og 10^{-6} M) av isoprenalin i nærvær av 0,5 mM IBMX i fem minutter. Cellene ble høstet og cAMP-assay gjennomført som beskrevet i metod delen. Resultatet er presentert som gjennomsnitt \pm SEM av tre uavhengige forsøk.

3.3 Doseavhengig effekt av rosiglitazon og NSAIDs

Med en celletetthet på 50 000 celler/cm², stod cellene ett døgn i serumholdig medium, tilsatt penicillin, streptomycin, glutamin (2 mM) og 10 % hesteserum. Deretter ble det byttet til serumfritt medium og cellene inkubert i enda ett døgn. Videre ble cellene stimulert med forskjellige ligander i økende konsentrasjoner, og inkubert en siste gang i serumfritt medium i 20 timer. Til slutt ble cellene stimulert med 1 µM PGE₂ i nærvær av 0,5 mM IBMX i fem minutter, før cAMP-assay ble utført som beskrevet i metoddelen (se 2.3.1).

3.3.1 Rosiglitazon

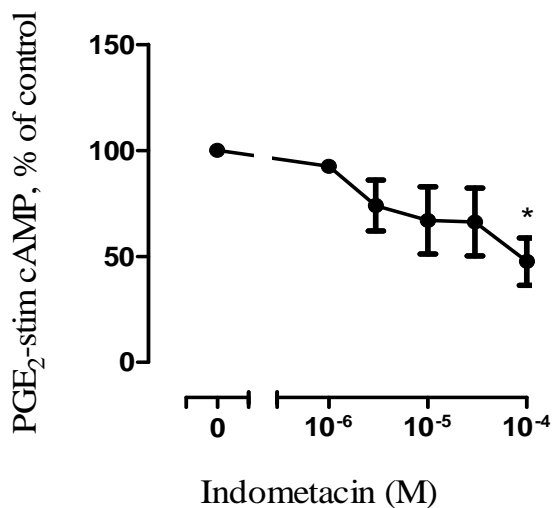
Cellene ble forbehandlet med rosiglitazon i konsentrasjonene 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M og 10⁻⁵ M. Det ble utført seks uavhengige forsøk med rosiglitazon, og som figur 9 viser, var det liten spredning mellom forsøkene. Etter utført enveis variansanalyse (ANOVA) med Bonferroni-korreksjon for parvis sammenligning, ble det funnet en signifikant (p=0,0003) dose-avhengig effekt av rosiglitazon, og en signifikant forskjell fra kontrollen ved konsentrasjonene 1 og 10 µM (*).



Figur 9: Dose-avhengig effekt av rosiglitazon på PGE₂-stimulert cAMP-produksjon i HT29-celler. Resultatet er presentert som gjennomsnitt ± SEM av seks uavhengige forsøk. * indikerer at resultatet er funnet signifikant forskjellig fra kontrollen ved parvis sammenligning og bruk av Bonferroni-korreksjon.

3.3.2 Indometacin

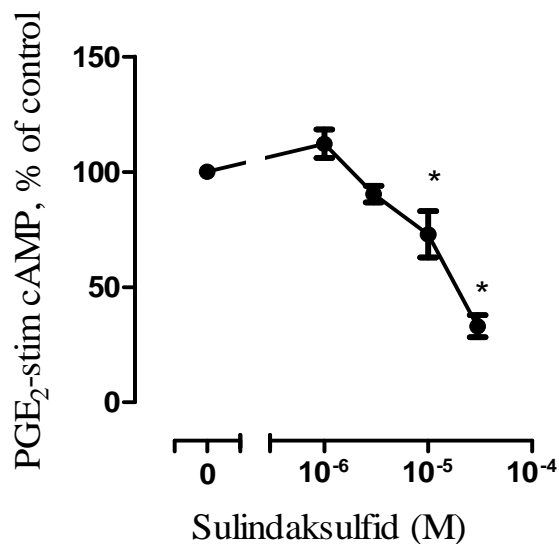
Cellene ble forbehandlet med indometacin i konsentrasjonene 1, 3, 10, 30 og 100 μM i disse forsøkene. Med indometacin ble det utført fire uavhengige forsøk, og som figur 10 viser, er spredningen mellom forsøkene stor. ANOVA analysen ($p\text{-verdi}=0,0667$) med Bonferroni-korreksjon viste at indometacin ikke utøver en signifikant dose-avhengig effekt, men at effekten av liganden er signifikant forskjellig fra kontrollen ved 100 μM (*).



Figur 10: Dose-avhengig effekt av indometacin på PGE₂-stimulert cAMP-produksjon i HT29-celler. Resultatet er presentert som gjennomsnitt \pm SEM av fire uavhengige forsøk. * indikerer at resultatet er funnet signifikant forskjellig fra kontrollen ved parvis sammenligning og bruk av Bonferroni-korreksjon.

3.3.3 Sulindaksulfid

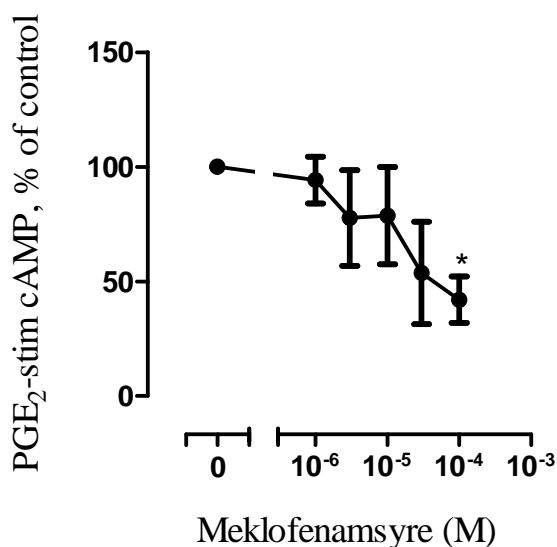
Cellene ble forbehandlet med sulindaksulfid i konsentrasjonene 1, 3, 10 og 30 μM . Det ble utført fire uavhengige forsøk. Som figur 11 viser, er det liten spredning mellom forsøkene. Med ANOVA ble det funnet en signifikant ($p < 0,0001$) dose-avhengig effekt av sulindaksulfid, og figuren viser at det er en signifikant reduksjon i mengde cAMP ved konsentrasjonene 10 og 30 μM (*).



Figur 11: Dose-avhengig effekt av sulindak sulfid på PGE₂-stimulert cAMP-produksjon i HT29-celler. Resultatet er presentert som gjennomsnitt \pm SEM av fire uavhengige forsøk. * indikerer at resultatet er funnet signifikant forskjellig fra kontrollen ved parvis sammenligning og bruk av Bonferroni-korreksjon.

3.3.4 Meklofenamsyre

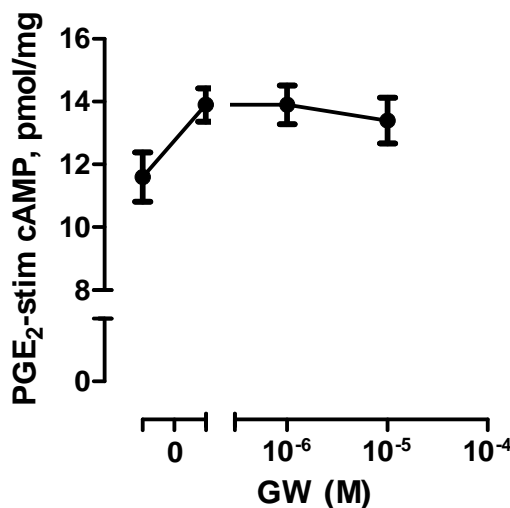
Cellene ble forbehandlet med meklofenamsyre i konsentrasjonene 1, 3, 10, 30 og 100 μM . Det ble utført tre uavhengige forsøk. Som figur 12 viser, er det stor spredning mellom forsøkene, men konsentrasjonene 1 og 100 μM skiller seg ut med å ha en noe mindre spredning. Med ANOVA ble det funnet en signifikant ($p=0,0417$) dose-avhengig effekt av meklofenamsyre. Ved parvis sammenligning var effekten signifikant kun ved 100 μM (*).



Figur 12: Dose-avhengig effekt av meklofenamsyre på PGE₂-stimulert cAMP-produksjon i HT29-celler. Resultatet er presentert som gjennomsnitt \pm SEM av tre uavhengige forsøk. * indikerer at resultatet er funnet signifikant forskjellig fra kontrollen ved parvis sammenligning og bruk av Bonferroni-korreksjon.

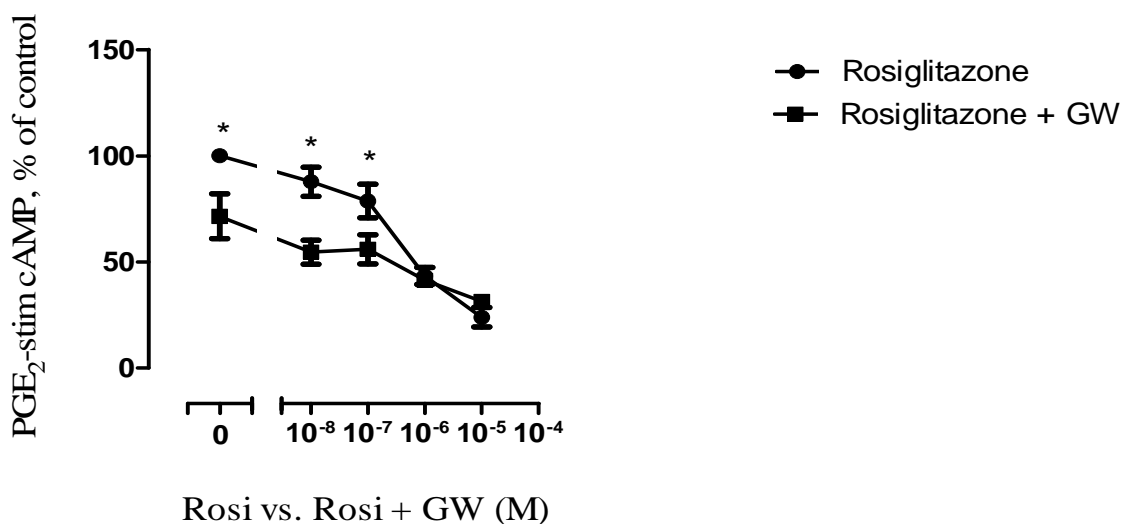
3.4 Effekt av 10 μ M GW9662

For å bekrefte om effekten av NSAIDs medieres via PPAR γ , ønsket jeg å hemme PPAR γ med en antagonist. GW9662 er i litteraturen beskrevet som en PPAR γ -antagonist [40]. Før vi brukte GW9662 for å se om den hemmet effekten av rosiglitazon var det nødvendig å finne ut om GW9662 hadde en egen effekt på PGE $_2$ -stimulert cAMP-produksjon. Etter ett døgn i serumfritt medium, ble cellene forbehandlet med GW9662 i konsentrasjonene 10^{-7} , 10^{-6} og 10^{-5} M. Etter enda et døgn i serumfritt medium, ble cellene høstet og PGE $_2$ -stimulert cAMP-akkumulering målt som beskrevet i metodedelen (se 2.3.1). Som figur 13 viser, har GW9662 opptil 10^{-5} M, ingen signifikant egen effekt, sammenlignet med DMSO.



Figur 13: Effekt av GW9662 på PGE $_2$ -stimulert cAMP-produksjon. Med en celletetthet på 50 000 celler/cm 2 , stod cellene i serumholdig medium (10 %) i ett døgn. Deretter ble det byttet til serumfritt medium og cellene ble inkubert i et døgn til. Videre ble cellene forbehandlet med forskjellige konsentrasjoner av GW9662 eller kun serumfritt medium, og inkubert i minst 20 timer, før cellene ble stimulert med 1 μ M PGE $_2$ i nærvær av 0,5 mM IBMX i fem minutter. Cellene ble deretter høstet og cAMP-assay gjennomført som beskrevet i metodedelen. Resultatet er presentert som middelerdi \pm SEM (n=3) av ett forsøk.

Det ble utført dose-respons forsøk med rosiglitazon \pm GW9662 for å undersøke om antagonist hemmet effekten av rosiglitazon. Cellene ble først preinkubert med GW 9662 (10 μ M) eller DMSO (0,5 %) i 30 minutter. Deretter ble cellene stimulert med rosiglitazon i samme konsentrasjoner som beskrevet i 3.3.1, og igjen tilsatt GW9662 og DMSO. Som figur 14 viser, har GW9662 alene en signifikant reduserende effekt på PGE₂-stimulert cAMP-produksjon, sammenlignet med DMSO ($p < 0,0001$). Etter parret sammenligning (Bonferroni-korreksjon), viser resultatet at prostaglandinresponsen i nærvær av GW9662 alene eller GW9662 i nærvær av rosiglitazon 10^{-8} og 10^{-7} M var signifikant redusert i forhold til kontrollen behandlet med DMSO.



Figur 14: Dose-avhengig effekt av rosiglitazon \pm GW9662 på PGE₂-stimulert cAMP-produksjon i HT29-celler. Resultatet er presentert som gjennomsnitt \pm SEM av fem uavhengige forsøk. * indikerer at celler forbehandlet med DMSO gir signifikant høyere cAMP-respons enn celler forbehandlet med GW9662 (Bonferroni-korreksjon).

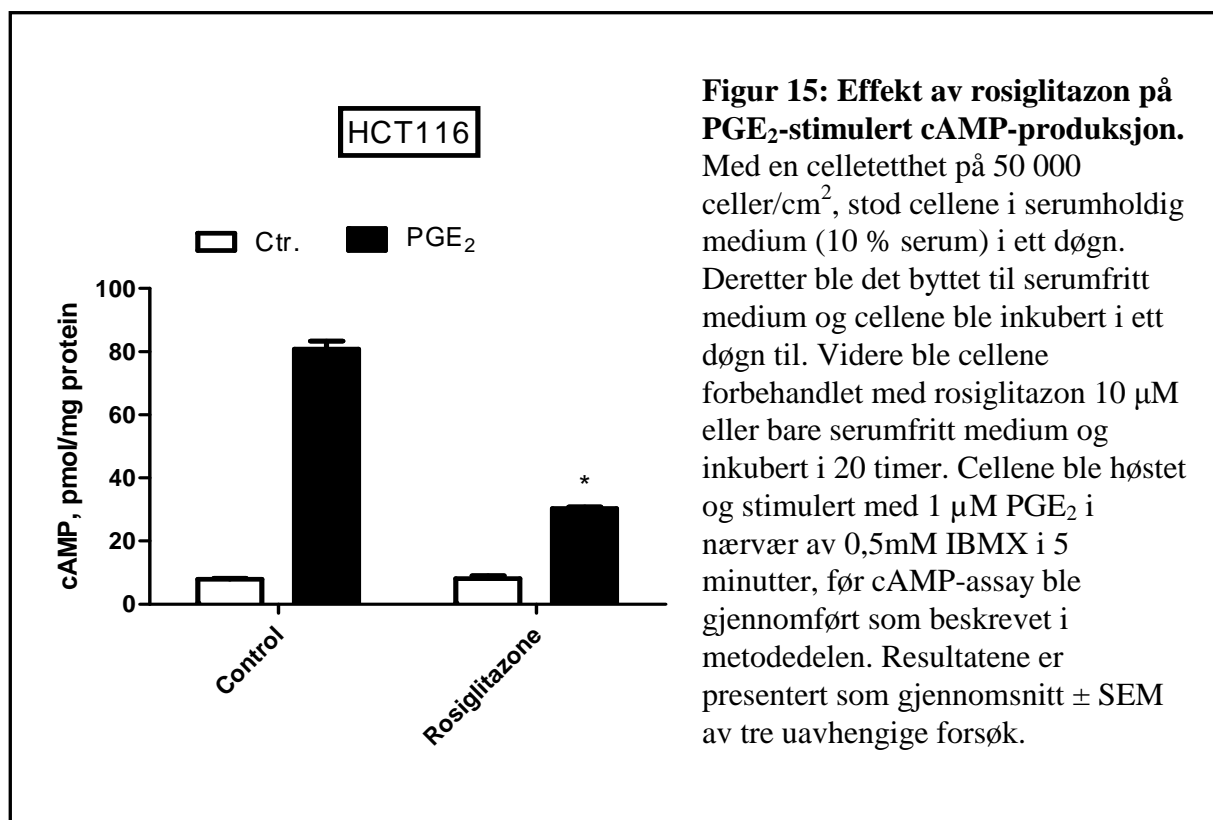
3.5 Effekt av rosiglitazon på HCT116-celler

I en tidligere masteroppgave [47] ble det ikke funnet signifikant effekt av rosiglitazon-forbehandling på PGE₂-stimulert cAMP-akkumulering i HCT116-celler. Dette var i samsvar med hypotesen om at PPAR γ -stimulering nedregulerer EP2-reseptorer, da PGE₂-stimulert cAMP-akkumulering i HCT116 i hovedsak er mediert av EP4-reseptorer (Sandnes, upubliserte data). Ved nærmere gjennomgang av resultatene viste det seg at det var stor spredning mellom forsøkene, og vi fant det derfor nødvendig å gjenta dem. Dette ble også interessant i lys av en ny artikkel som viste at troglitazon nedregulerer EP4 mRNA via en PPAR γ -uavhengig mekanisme i glioblastomceller [60].

3.5.1 Stimulering av cellene med PGE₂

Som HT29-cellene, uttrykker også HCT116-cellene EP-reseptorer, hovedsakelig EP2 og EP4. Cellene ble forbehandlet med 10 μ M rosiglitazon, og det ble undersøkt om det oppstod en reduksjon i PGE₂-stimulert cAMP-produksjon. Cellene ble stimulert med 1 μ M PGE₂ i nærvær av fosfodiesterasehemmeren IBMX i fem minutter før reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 5 % TCA.

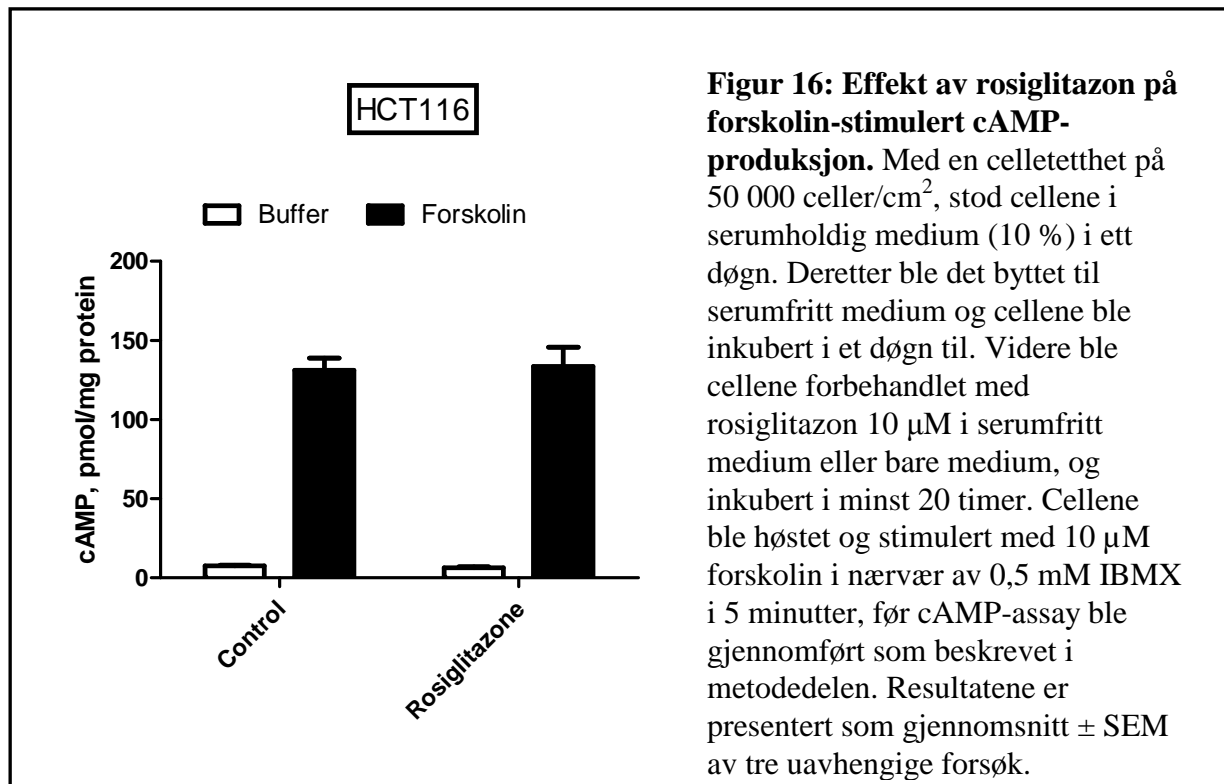
Som resultatet viser (figur 15), gav forbehandling av cellene med rosiglitazon i 20 timer en redusert PGE₂-stimulert cAMP-produksjon. Det var liten spredning mellom forsøkene, og det viste seg at det var en signifikant forskjell i cAMP-mengden mellom kontrollceller og celler forbehandlet med rosiglitazon (t-test, $p < 0,0001$). Rosiglitazon utøver en effekt på PGE₂-responsen i cellene.



3.5.2 Stimulering av cellene med forskolin

For å undersøke om effekten av rosiglitazon var spesifikk for PGE₂-stimulering av EP-reseptorene, eller om reduksjonen av cAMP-produksjonen skyldes påvirkning av hele cyklasesystemet, ble det benyttet forskolin. Cellene ble stimulert med forskolin 10 µM i nærvær av 0,5 mM IBMX i fem minutter før tilsetning av 5 % TCA som stoppet reaksjonen.

Som resultatet viser (figur 16), gav forbehandling med 10 µM rosiglitazon ingen endring i forskolin-stimulert cAMP-produksjon. Dette ble bekreftet ved t-test ($p=0,8645$) som viste at det ikke var signifikant forskjell mellom kontrollceller og celler forbehandlet med rosiglitazon når det gjelder forskolin-stimulert cAMP-produksjon. Rosiglitazon utøver dermed ingen effekt på forskolin-responsen, verken i HCT116-cellene eller HT29- cellene (se 3.2.2).



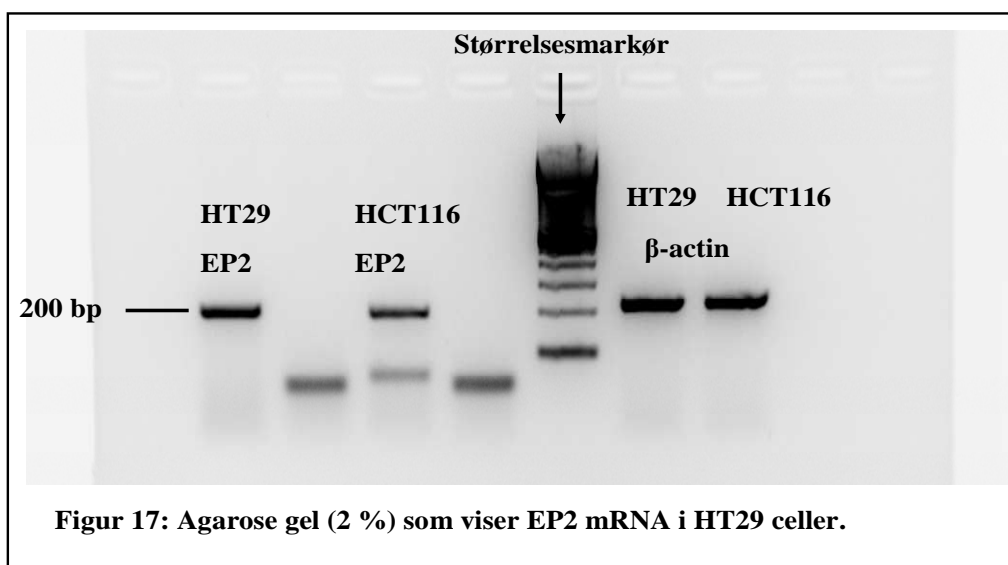
3.6 Kontroll av RNA

En forutsetning for å gjøre PCR-analyse er at RNA er av god kvalitet. RNA kvaliteten kan vurderes både spektrofotometrisk og ved gelelektroforese. Ved å måle absorbansen ved 260 nm (A_{260}) kan konsentrasjonen og kvaliteten av RNA bestemmes. Forholdet mellom absorbansen ved 260 nm og 280 nm, gir et estimat på renheten av RNA med hensyn til protein. En A_{260}/A_{280} ratio mellom 1,8-2,0 indikerer at RNA er av god kvalitet.

For å bekrefte RNA kvaliteten, ble det utført en gelelektroforese, hvor 18S og 28S rRNA fragmentene vil separeres. De to båndene farges av GelRed 10000x tilsatt i agarosegelen. Dersom RNA er intakt og av god kvalitet vil båndene for 18S og 28S foreligge som to separate og intakte bånd når gelen gjennomlyses med ultrafiolett (UV) lys. Resultatene våre viste tegn til at 18S og 28S forelå som to separate bånd, selv om det ikke var så tydelig som vi hadde ønsket (data ikke vist).

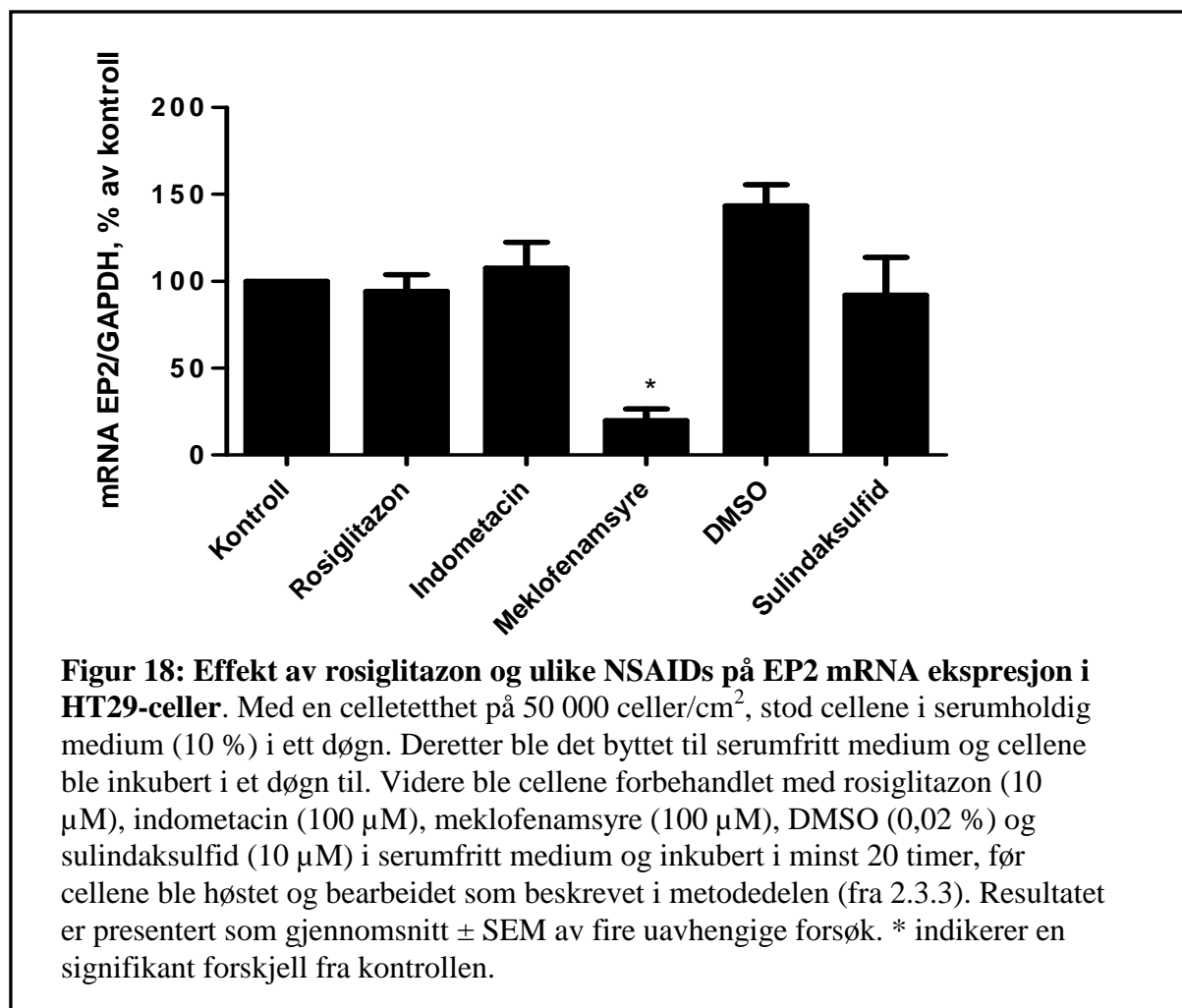
3.7 Kontroll av primere

Tradisjonell RT-PCR og gelelektroforese ble brukt for kvalitativ screening av EP2- og EP4-reseptor ekspresjon i HT29-cellene, samtidig som vi får undersøkt om de nydesignede primerne fungerte slik de skulle. I tillegg til primere for EP2- og EP4-reseptorer, ble det også kjørt prøver med primere for β -actin. β -actin mRNA er uttrykt i et moderat nivå i flere celletyper, og det båndet som kommer opp etter kjørt gelelektroforese, fungerer som en kontroll på vellykket PCR-reaksjon. Etter å ha prøvd med ulike temperaturer for "annealing"-trinnet fikk vi opp bånd for EP2-reseptoren med ny primer ved riktig størrelse (~ 200 bp) (figur 17), og vi kunne fortsette med kvantitativ RT-PCR. Vi lyktes ikke i å finne optimale betingelser for deteksjon av EP4 mRNA i tide, og utelot derfor kvantitering av EP4 mRNA.



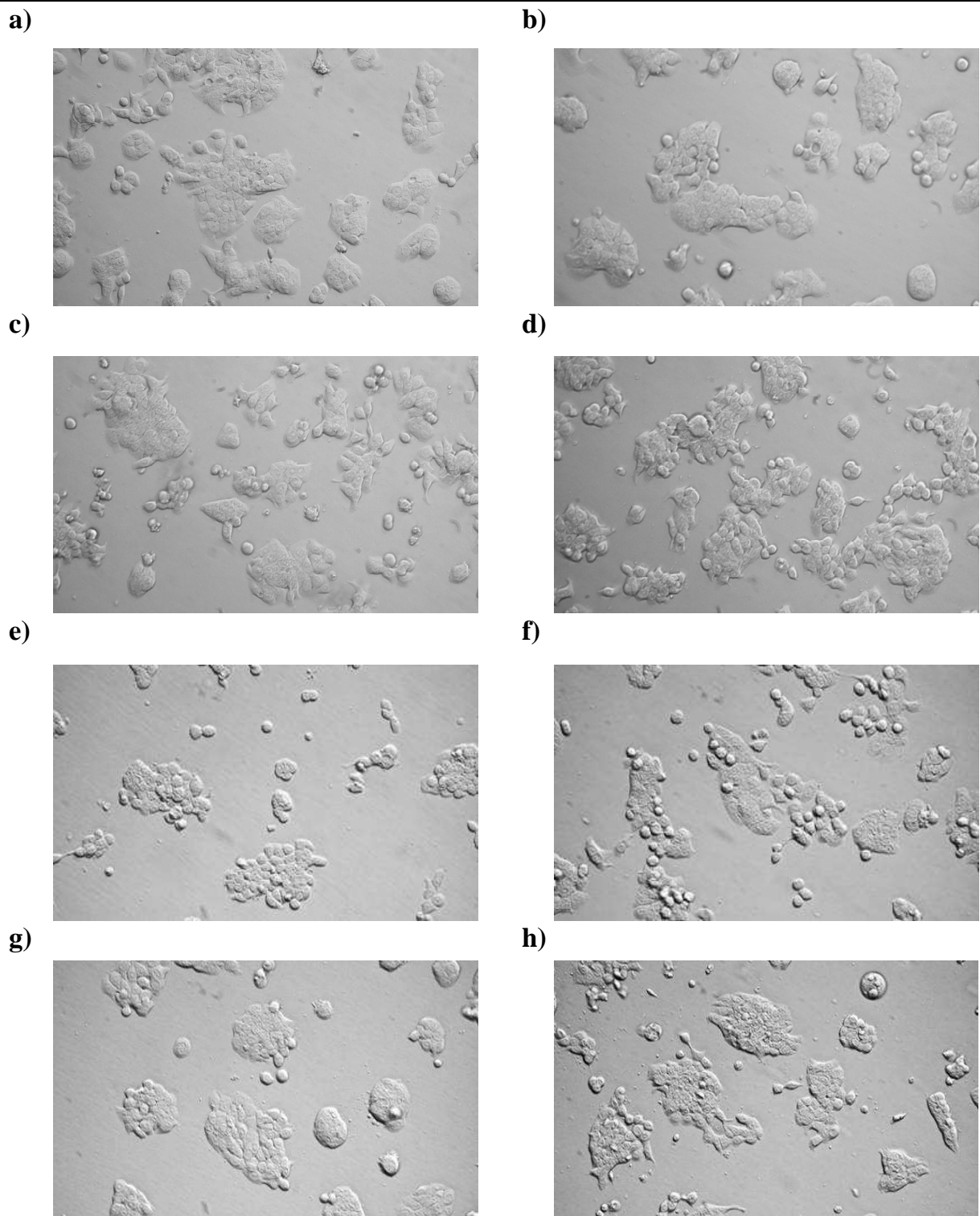
3.8 Kvantitativ PCR

I denne oppgaven ble kvantitativ RT-PCR brukt for å bestemme nivået av EP2 mRNA i HT29-celler, og for å undersøke om ekspresjonen påvirkes av rosiglitazon og de utvalgte NSAIDs. Dette er en sensitiv metode for påvisning av små mengder mRNA, samtidig som det er mulig å analysere genekspresjonen i flere prøver samtidig [54]. Som resultatet viser, figur 18, er det et uttrykk av EP2 mRNA i HT29-cellene (kontroll). Sønn som resultatet er presentert, et gjennomsnitt av fire forsøk, er det kun meklofenamsyre som nedregulerer EP2 mRNA ekspresjonen, sammenlignet med kontroll. I enkeltforsøkene var det i to av forsøkene også en signifikant nedregulering av EP2 mRNA-nivået med rosiglitazon og indometacin (data ikke vist). Sammenlignet med DMSO, nedregulerer også sulindaksulfid EP2-ekspresjonen, men denne reduksjonen var ikke signifikant. Bonferroni-korreksjon med parvis sammenligning viste at det kun var meklofenamsyre som var signifikant forskjellig fra kontrollen. DMSO gav en oppregulering av EP2 mRNA-nivået, men denne økningen var ikke signifikant forskjellig fra kontrollen.



3.9 Cytotoksisitet

For å se etter tegn til cytotoksisitet, ble det tatt bilder av HT29-cellene etter dyrking ett døgn serumfritt og ett døgn serumfritt med tilsetning av rosiglitazon og de ulike NSAIDs (figur 19, a-h). Som figur 19 a-b viser, ser det ikke ut til at rosiglitazon 10 μM er cytotoksisk for cellene, da cellenes morfologi er uendret sammenliknet med kontrollen. Normalt vokser cellene i store celleøyer. Etter tilsetning av ligand i stigende konsentrasjon, så vi i mikroskopet at cellene skilte seg fra celleøyene og opptrådte mer som enkeltceller. De ble mer avgrenset, samtidig som celledørrelsen ble redusert (figur 19, c-h). Ved de aller høyeste konsentrasjonene; indometacin 100 μM , meklofenamsyre 100 μM og sulindaksulfid 30 μM , så man antydninger til døde celler, da disse løsner helt og flyter i væskelaget.



Figur 19: HT29-celler stimulert med rosiglitazon og ulike NSAIDs. a) Kontroll: ubehandlede celler. b) Celler stimulert med 10 μM rosiglitazon. c) Celler stimulert med 30 μM indometacin. d) Celler stimulert med 100 μM indometacin. e) Celler stimulert med 30 μM meklofenamsyre. f) Celler stimulert med 100 μM meklofenamsyre. g) Celler stimulert med 10 μM sulindaksulfid. h) Celler stimulert med 30 μM sulindaksulfid. Bildene er tatt med 20x forstørrelse.

4. Diskusjon

4.1 Metodologiske aspekter

Metodene som er benyttet i oppgaven er veletablerte på dette laboratoriet. På slutten av arbeidet kom jeg i tidsnød, og det medførte at kvantitativ PCR-bestemmelse av EP2-mRNA ikke ble så godt kvalitetssikret som ønskelig.

Indometacin, meklofenamsyre og isoprenalin forelå som vannløselige salter og ble tilsatt (etter fortykning) direkte i buffer eller medium. Rosiglitazon og PGE₂ var løst i etanol, og for å unngå å eksponere cellene for etanol ble stoffene dampet inn under nitrogen (N₂) og inndampingsrestene ble løst i buffer eller medium. For stoffene med dårlig vannløselighet, som sulindaksulfid, GW9662 og forskolin, ble DMSO benyttet som løsemiddel. DMSO ansees som et inert løsemiddel, det vil si at det ikke påvirker biologiske systemer. Konsentrasjonen av DMSO ble likevel holdt så lav som mulig av den grunn at cellene kan påvirkes av løsemidlet. I forsøkene med GW9662 ble det tilsatt DMSO i en endelig konsentrasjon på 0,5 %, mens det i forsøkene med sulindaksulfid ble brukt 0,06 % DMSO. I forsøkene med kvantitativ PCR viste det seg at cellene behandlet med DMSO (endelig konsentrasjon på 0,06 %) gav en økning i EP2 mRNA ekspresjonen, sammenlignet med kontrollen uten DMSO. Dette gikk igjen i samtlige av de fire forsøkene og kan tyde på at DMSO alene har en svak effekt på HT29-cellene.

4.1.1 Dyrking av celler i serumfritt medium 1 døgn vs. 2 døgn

Serum inneholder flere vekstfaktorer, og vil kunne gi optimal vekst av ulike celletyper etter at det er tilsatt i dyrkningsmediet. Siden serum inneholder så mange faktorer, er

det vanskelig å avgjøre hvilke som er av betydning for vekststimuleringen. En annen ulempe er at serumsammensetningen kan variere fra batch til batch, dette er et problem som kan unngås ved bruk av serumfritt medium. De fleste celler liker seg dårligere under serumfrie betingelser, og vi så at HT29-cellene hadde en tendens til å løsne under mediebytte. I tillegg løsnet noen celler under skylleprosessen med 0,9 % NaCl. Av den grunn var det ønskelig å redusere tiden cellene stod serumfritt ned til ett døgn og samtidig forbehandle dem med ligand. Til tross for at cellene liker seg dårligere under serumfrie betingelser, ble resultatene etter to døgn serumfritt mer reproducerbare enn de hvor cellene kun stod ett døgn, og det ble besluttet å fortsette med tidligere protokoll.

4.1.2 Kvaliteten av RNA

Kvaliteten av RNA kan bestemmes både spektrofotometrisk og ved gelanalyse. Ratio A_{260}/A_{208} viste verdier som lå mellom 1,9 og 2,03 ved samtlige forsøk, og tyder dermed på god kvalitet av RNA. Da vi gikk videre med gelanalyse, ble ikke resultatet helt som ønsket. 18S og 28S båndene som skulle komme til uttrykk som to separate og intakte bånd, var uklare og så ut til å være konsentrert i siden av brønnene. Dette kan tyde på ufullstendig solubilisering av RNA og bør undersøkes nærmere. Muligens ville en annen isoleringsmetode for RNA være bedre, eller celleekstraktene kunne fryses før RNA-isolering. Det kunne også vært aktuelt å prøve en annen metode for å undersøke RNA-kvaliteten. For eksempel finnes et Agilent Bioanalyzer instrument tilgjengelig på Rikshospitalet. Dette bestemmer både mengde og kvalitet av RNA i én operasjon og gir en mer objektiv evaluering av kvaliteten enn det en visuell inspeksjon av en gel kan gi. Dette ble det ikke tid til.

4.1.3 Kvantitativ PCR

Kvantitativ PCR involverer en rekke reaksjonskomponenter som vil kunne påvirke sluttproduktet etter kjørt PCR-reaksjon, eksempelvis primere, reaksjonsbuffer, dNTP mix og DNA polymeraser som tåler relativt høy temperatur ($> 56^{\circ}$). RT-PCR analyse av cellulær mRNA ekspresjon involverer flere tekniske trinn som vil kunne påvirke sluttresultatet. Prinsipp som er av vesentlig betydning for sluttresultatets pålitelighet er god kvalitet på cellene og optimal celletetthet i prøvene, isolering av rent og intakt RNA, samt nøyaktighet i cDNA syntesen. Kun en liten mengde kontaminasjon i løpet av disse prosessene, vil være nok til å påvirke analysen i negativ grad.

Vi mistenkte at prøvene inneholdt lite EP2 mRNA, og at det dermed var risiko for forstyrrelser fra genomisk DNA. Dette ble avkreftet av reaksjonene uten revers transkriptase (RT), som ble kjørt parallelt nettopp som kontroll på genomisk DNA kontaminasjon, da resultatene fra prøvene uten RT viste en betryggende forskjell i C_t (C_t for prøver rundt 30 sykluser, C_t for prøver uten RT ~ 40 sykluser). Primere som binder seg til andre gensekvenser enn det som er ønsket, vil også generere signal og dermed gi misvisende resultat ved deteksjon med SYBR[®] Green. For å bekrefte at resultatet ikke var påvirket av primer-dimerisering eller uspesifikke produkter, ble PCR-produktet testet ved en smeltepunktsanalyse. Denne analysen vil bekrefte produktidentiteten, samt skille mellom spesifikke og uspesifikke produkter. I samtlige forsøk viste smeltepunktsanalysen kun én topp, og det vil si at primerne er spesifikke.

4.2 Er effekten av rosiglitazon spesifikk for EP2-responsen?

Som vist i figur 5 utøver rosiglitazon en effekt på PGE₂-responsen i HT29-cellene ved å redusere cAMP-produksjonen. For å undersøke om effekten av rosiglitazon er spesifikk for PGE₂-stimulering av EP2-reseptorene, eller om reduksjonen av cAMP-

produksjonen skyldes påvirkning av hele cyklasesystemet, valgte vi å stimulere cellene med forskolin og isoprenalin. Rosiglitazon gav ingen effekt på forskolin-responsen (verken i HT29- eller HCT116-cellene), noe som tyder på at effekten er på reseptoren eller reseptor- G_s koplingen. Disse funnene er i samsvar med hypotesen om at $PPAR\gamma$ -stimulering nedregulerer EP2-reseptorer i HT29-cellene. Stimuleringen av cellene med isoprenalin gav derimot uventede resultater. Det var en økning i cAMP-produksjonen etter at cellene ble forbehandlet med rosiglitazon. Dette kan tyde på at rosiglitazon utøver en stimulerende effekt på ekspresjonen av β -adrenerge reseptorer, eller at koplingen mellom β -adrenerge reseptorer og G_s påvirkes. Dette bør undersøkes videre.

Forbehandling med rosiglitazon i HCT116-celler førte også til en reduksjon i PGE_2 -stimulert cAMP-produksjon. Denne reduksjonen (ca. 62 %) er for stor til å skyldes nedregulering av EP2-reseptorer alene. Tidligere studier har vist at ca. 70 % av PGE_2 -stimulert cAMP-akkumulering i HCT116-cellene medieres via EP4-reseptorer (Sandnes, upublisert data). Dette tyder på at det også er en nedregulering av EP4-reseptorene. Dette kan undersøkes ved bruk av selektive ligander i cAMP-assayet, som butaprost (spesifikk EP2-agonist) eller L-161982 (EP4-selektiv antagonist). Kambe og medarbeidere fant at $PPAR\gamma$ -agonisten troglitazon nedregulerer EP4 mRNA via en $PPAR\gamma$ -uavhengig mekanisme i glioblastomceller [60]. De fant at liganden aktiverer MEK-1/Erk-signalveien, som induserer fosforylering av transkripsjonsfaktoren Sp-1. Fosforyleringen fører til redusert DNA-binding til Sp-1 bindingssetet i promoteren på genet for den humane EP4-reseptoren og forårsaker nedregulering av EP4 ekspresjon [60].

For å få en bekreftelse på om rosiglitazon sin reduserende effekt på PGE_2 -stimulert cAMP-produksjon virkelig skyldes nedregulering av EP2- og EP4-reseptorer, burde både HT29- og HCT116-cellene undersøkes på mRNA-nivå. Vi fikk gjort noen forsøk med HT29-cellene hvor vi kjørte kvantitativ RT-PCR og så på EP2 mRNA. Vi fant

ikke at rosiglitazon nedregulerer nivået av EP2 mRNA sammenlignet med kontrollen. Men to av forsøkene med rosiglitazon gav nedregulering av EP2 mRNA-ekspressjonen, og det vil dermed være nødvendig med flere forsøk for å få et statistisk sikrere resultat. Vi målte mengden mRNA på et relativt sent tidspunkt, det vil si på samme tidspunkt som PGE₂-stimulert cAMP-produksjon var redusert. Forutsatt at denne reduksjonen skyldes nedsatt mengde reseptorer, ville en forvente at mRNA-nivået ble redusert før proteinet. En annen mulig forklaring er at det ikke er mRNA-syntesen som påvirkes. Det kunne være at behandlingen fører til redusert stabilitet av mRNA eller protein, eller at proteinsyntesen påvirkes. Det hadde derfor vært interessant å se om resultatet hadde blitt annerledes om målingen av mRNA hadde blitt gjort på et tidligere tidspunkt, for eksempel før man oppnådde en redusert proteinmengde. Et annet alternativ ville vært å benytte seg av bindingsstudier. Fordi prostaglandiner er lipofile og reseptormengden er lav, er det sannsynlig at det ville være vanskelig å måle reseptormengden på denne måten.

4.3 Effekt av GW9662

Det ble kun gjennomført ett forsøk med GW9662, hvor ligandens egeneffekt på PGE₂-stimulert cAMP-produksjon ble undersøkt (figur 13). I lys av resultatene vi fikk i ettertid bør egeneffekten av GW9662 undersøkes mer nøyaktig.

GW9662 binder seg kovalent til en cysteingrouppe i PPAR γ [40]. Dette tyder på at molekylet er reaktivt og også kan reagere med andre proteiner i cellene. I mine forsøk ble det brukt 10 μ M GW9662, og cellene ble preinkubert med liganden i 30 minutter før tilsetning av rosiglitazon (10 μ M). Dersom GW9662 hadde vært en reversibel antagonist, går det an ut fra vanlig reseptorteori å beregne hvor stor andel av reseptoren

som da vil være tilgjengelig for rosiglitazon. Ut fra massevirkningsloven har vi da følgende konkurrerende reaksjon (likning 1) [61].

$$(1) \quad I + R = RI \text{ og } L + R = RL$$

Der I = inhibitor, R = reseptor og L = agonist.

$$(2) \quad K_I = \frac{(R)(I)}{(RI)} \text{ og } K_L = \frac{(R)(L)}{(RL)}$$

Ved å sette total reseptorkonsentrasjon $R_t = RL + RI + R$ og omorganisere, kommer man fram til likning 3:

$$(3) \quad (RL) = \frac{(L)(R_t)}{K_L \left(1 + \frac{I}{K_I} \right) + (L)}$$

Vi kjenner ikke K_L og K_I , men bruker som en tilnærming $K_L \sim EC_{50} = 18 \text{ nM}$ ($\sim 2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) for rosiglitazon og $K_I \sim IC_{50} = 3,8 \text{ nM}$ ($\sim 4 \cdot 10^{-9} \text{ M}$) for GW9662 bestemt i bindingsstudier av Seimandi og medarbeidere [41]. Det fører til at med disse forutsetningene vil 17 % av reseptorene være bundet av rosiglitazon ved likevekt. Dette skulle tilsi at GW9662 burde hemme mye av responsen ved de anvendte konsentrasjonene av GW9662 og rosiglitazon. Siden GW9662 er en irreversibel hemmer og cellene preinkuberes med GW9662, bør de fleste reseptorene være utilgjengelig for rosiglitazon, forutsatt at liganden tas godt opp av cellene.

I andre studier er det brukt henholdsvis 10 μM GW9662 og preinkubasjonstid på én time, og 20 μM GW9662 med preinkubasjonstid på én time, før tilsetning av rosiglitazon 10 μM . I begge studiene viste resultatene at GW9662 hemmet effekten induisert av rosiglitazon [48, 62]. Vi kunne forsøkt med ulike konsentrasjoner av GW9662, i tillegg til å øke preinkubasjonstiden for å se på den hemmende effekten av liganden på effekten av rosiglitazon, dette er noe som krever videre utredning. Det ville også være nyttig å finne en effekt som er en etablert $\text{PPAR}\gamma$ -effekt, og studere

effekten av GW9662 på denne, for eksempel induksjon av ADRP (adipose differentiation-related protein), som er et mye brukt mål på PPAR-aktivitet, og som induseres av alle PPAR-subtyper [63].

Det foreligger flere rapporter om PPAR γ -uavhengige effekter av PPAR γ -agonister. Han og Roman [48] observerte at den hemmende effekten av rosiglitazon (10 μ M) og ciglitazon (30 μ M), to PPAR γ -ligander, på EP2-ekspresjonen ble forhindret dersom det samtidig ble stimulert med GW9662 (20 μ M). Men GW9662 blokkerte ikke den hemmende effekten utøvet av PGJ₂ (10 μ M), som er en endogen PPAR γ -ligand [48]. Resultater etter forsøk utført av Seargent og medarbeidere [64] støttet teorien om at det eksisterer PPAR γ -uavhengige mekanismer. De viser at GW9662, i tillegg til å hemme PPAR γ -aktiviteten, også hindret cellevekst og celleoverlevelse uavhengig av PPAR γ [64]. Sammen tyder disse funnene på at det trolig er både PPAR γ -avhengige og – uavhengige signaler involvert i nedreguleringen av EP2-reseptornivået. PPAR γ -ligander har vist seg å kunne regulere celleveksten via effekter på ulike kinasesignalveier, deriblant Erk-signalering. I lungekarsinomceller behandlet med en MAPK/Erk-hemmer (PD98059) i én time før tilsetning av troglitazon, en PPAR γ -ligand, ble det observert at PD98059 blokkerte hemmingen av EP2 protein-ekspresjonen induert av troglitazon. Det ble i tillegg vist at troglitazon stimulerte Erk1/2 fosforylering, som bekrefter at Erk-signalering er involvert i nedreguleringen av EP2-reseptor ekspresjonen utøvet av PPAR γ -ligander i disse cellene [48]. Kambe og medarbeidere viste at sulindaksulfid reduserte EP4-ekspresjonen i glioblastomceller via endringer i Egr-1/Sp-1 signalveien, hvor Egr-1 normalt er ansvarlig for oppreguleringen av EP4-nivået, mens Sp-1 har en reduserende effekt. Sulindaksulfid øker ekspresjonen av Egr-1 og Sp-1, og endrer fosforyleringen av proteinene via Erk. Som en konsekvens av dette, induseres NAG-1 og ATF3, etterfulgt av en nedregulering av EP4 mRNA-nivået [65].

4.4 Utøver NSAIDs noen av sine effekter via PPAR γ ?

Som nevnt tidligere kan enkelte NSAIDs utøve antiproliferative effekter via COX-uavhengige mekanismer, deriblant via PPAR γ -aktivering [7-9]. Sulindaksulfid er tidligere vist å være en PPAR γ -agonist. Liganden hemmet celleveksten i en type lungecancer i en høyere konsentrasjon enn det som kreves for å hemme PGE₂-syntesen [66]. Indometacin har i høye konsentrasjoner (< 100 μ M) bundet seg til og aktivert PPAR γ [45]. Det har vært undersøkt om denne aktiveringen forklarer indometacin sin antiproliferative effekt på humane coloncancer celler (HCT116). Mutant dominant-negativ human PPAR γ ble brukt til å blokkere endogen PPAR γ -aktivitet. Det viste seg imidlertid at de antiproliferative effektene ikke endret seg i nærvær av dominant-negativ PPAR γ . Til tross for indometacin sin evne til å aktivere PPAR γ , bidrar ikke denne effekten til den antiproliferative aktiviteten i disse cellene [44].

I denne oppgaven ble det sett en dose-avhengig reduksjon i PGE₂-stimulert cAMP-produksjon etter forbehandling med samtlige NSAIDs. Effekten var kun signifikant forskjellig fra kontrollen ved de høyeste konsentrasjonene. For indometacin og meklofenamsyre var det stor spredning mellom forsøkene, og det gav utslag på ANOVA-analysen, ved at resultatene ikke ble statistisk signifikante. Av den grunn er det nødvendig å gjøre flere forsøk med disse ligandene. Resultatet er i samsvar med hypotesen vår om at en aktivering av PPAR γ -reseptoren nedregulerer EP2-reseptornivået. For å bekrefte hypotesen var planen å stimulere cellene i nærvær av GW9662, en selektiv PPAR γ -antagonist. Disse forsøkene gav ikke forventet effekt, og bør forfølges videre. Ved hjelp av reporterassay eller ved bruk av et egnet gen som induseres av PPAR γ , bør man oppnå et funksjonelt mål på at PPAR γ blokkeres av GW9662. En annen mulighet vil være å bruke celler med siRNA-mediert ”knockdown” av PPAR γ . Bruken av PPAR γ -antagonister er i prinsippet et godt verktøy for å studere ulike PPAR γ -signalveier [40, 48]. Tidligere studier har vist at GW9662 ikke aktiverer PPAR γ -mediert transkripsjon, men hemmet effekten av rosiglitazon [40, 41]. I et annet arbeid ble det imidlertid observert at GW9662 alene

hadde en veksthemmende effekt på en brystkreftcellelinje, og GW9662 forsterket også den veksthemmende effekten av rosiglitazon [64]. Dette tyder på at GW9662 kan ha andre effekter, som kan ha sammenheng med at den har evnen til å binde seg kovalent til PPAR og muligens også til andre proteiner i cellene. Våre resultater med rosiglitazon i kombinasjon med GW9662 førte til at den videre planen med å behandle cellene med GW9662 og de utvalgte NSAIDs, ble lagt på is. I videre studier bør derfor effekten av NSAIDs på PPAR γ bekreftes eller avkreftes ved å kombinere forbehandlingen med GW9662. Alternativt kan siRNA benyttes for å hemme ekspresjonen av PPAR γ .

Sett i lys av funnene med rosiglitazon i HCT116-cellene, ville det være interessant å undersøke effekten av NSAIDs også i disse cellene. I tillegg hadde det vært av interesse å undersøke om NSAIDs også øker β -responsen i HT29-cellene, slik rosiglitazon uventet gjorde.

4.5 Kan PPAR γ -aktivering nedregulere EP2- (og EP4-) reseptornivået?

Aktivering av EP2- og EP4-reseptorer gir et økt nivå av cAMP i cellene via kobling til G_s-protein og en stimulering av adenylyl cyklase [17, 18]. Å bruke cAMP-produksjon som mål på nivået av EP-reseptorene, er en indirekte metode for å undersøke om en eventuell PPAR γ -aktivering vil påvirke EP-reseptornivået, da det i følge vanlig reseptorteori er korrelasjon mellom respons og reseptorbinding. Et unntak vil være hvis cellene har et høyt reseptortall, da kan man ha "spare receptors", det vil si at aktiveringen av en liten andel av reseptorene gir maksimal respons. Resultatene fra cAMP-analysen viste at samtlige NSAIDs og rosiglitazon gav en redusert PGE₂-stimulert cAMP-produksjon. Dette taler for en felles virkningsmekanisme, og er

forenlig med at effekten medieres via PPAR γ . Vi ønsket videre å undersøke om denne effekten kunne knyttes opp til nedregulering av EP2-reseptorer.

Tidligere studier med indometacin viste redusert PGE₂-stimulert cAMP-produksjon i en annen type coloncancer med ekspresjon av EP2-reseptorer, LS174T. Om denne effekten skyldtes nedregulering av EP2-reseptorer, ble undersøkt ved å måle mengden EP2 mRNA ved bruk av gelanalyse. Dette er i beste fall en semikvantitativ metode. Resultatet viste at indometacin gav en dose-avhengig reduksjon av EP2-reseptor mRNA [43]. Det er også gjort forsøk hvor humane lungekarsinomceller, som viser uttrykk av EP2-reseptorer, ble stimulert med rosiglitazon og ciglitazon, to PPAR γ -agonister. Resultatet av disse forsøkene viste at celleveksten ble hemmet via en nedregulering av EP2 mRNA-nivået [48]. To nye artikler viste derimot til resultater hvor både troglitazon, en PPAR γ -agonist, og sulindaksulfid, en COX-hemmer, nedregulerte EP4 mRNA-nivået i glioblastomceller via PPAR γ -uavhengige mekanismer [60, 65].

Kvantitativ RT-PCR er en mer nøyaktig metode sammenlignet med den Fujino og medarbeidere brukte [43] for å undersøke endringer i EP2 mRNA-nivået etter forbehandling med utvalgte ligander. Det var bare meklofenamsyre som gav et signifikant lavere nivå av EP2 mRNA sammenlignet med kontrollen i mine forsøk. Sulindaksulfid og DMSO gav henholdsvis en svak nedregulering og en svak oppregulering av EP2 mRNA-nivået, men effektene var ikke signifikante. Vi valgte i disse forsøkene å bruke 10 μ M sulindaksulfid for å unngå cytotoxiskitet, men det er mulig at 30 μ M ville gitt større effekt. På grunn av stor spredning i forsøkene, vil det være nødvendig å gjennomføre flere forsøk for å oppnå reproducerbare resultater. De ujevne resultatene kan skyldes metodologiske problemer, dermed bør metodene optimaliseres ytterligere.

4.6 Opptrer effektene av NSAIDs ved konsentrasjoner som er klinisk relevante?

Da vi undersøkte PGE₂-stimulert cAMP-produksjon, var at det var en signifikant reduksjon i cAMP-mengden ved de høyeste konsentrasjonene av samtlige NSAIDs, sammenlignet med kontrollen. Underveis i arbeidet med oppgaven ble det tatt bilder av cellene etter ligandstimulering, for å avdekke om det var tegn til cytotoksisitet (figur 19). Og som bildene viste var det ved de samme konsentrasjonene som gav redusert cAMP-respons av meklofenamsyre, indometacin og sulindaksulfid tegn til cytotoksisitet.

Flere studier har tatt i bruk samme ligander, og konsentrasjonene er i samsvar med, eventuelt noe høyere enn de som er benyttet i denne oppgaven. Fujino og medarbeidere [43], brukte indometacin 3-300 µM, i sine studier for å se om liganden hemmet PGE₂-stimulert cAMP produksjon. Her nevnes det at ved 300 µM indometacin ser det ut til at det er en uspesifikk effekt på stimuleringen av cAMP-produksjon, men at dette muligens skyldes toksisitet da omtrent 10 % av cellene lå løst i mediet [43]. Dette er imidlertid én av få som tar opp problemstillingen knyttet til cytotoksisitet.

4.7 Konklusjon

I denne oppgaven har jeg funnet at rosiglitazon og utvalgte NSAIDs, både indol-eddiksyrederivatene og fenamatet, nedregulerer PGE₂-stimulert cAMP-produksjon i coloncancer cellelinjen HT29. Dette er forenlig med en effekt mediert via PPAR γ , men det gjenstår å avklare om det er tilfellet. Effekten opptrer ved konsentrasjoner av NSAIDs som er svakt cytotoksiske, og som neppe oppnås ved terapeutisk bruk, men det utelukker ikke at effekten kan bidra også ved terapeutiske konsentrasjoner. Det er foreløpig uavklart om den reduserte cAMP-responsen skyldes nedregulering av EP-reseptorer eller andre mekanismer.

Kildeliste

1. Chan, T.A., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis, and colon-cancer chemoprevention*. Lancet Oncol, 2002. **3**(3): p. 166-74.
2. Ota, S., et al., *Review article: COX-2, prostanoids and colon cancer*. Aliment Pharmacol Ther, 2002. **16 Suppl 2**: p. 102-6.
3. Thun, M.J., S.J. Henley, and C. Patrono, *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(4): p. 252-66.
4. Brown, J.R. and R.N. DuBois, *COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention*. J Clin Oncol, 2005. **23**(12): p. 2840-55.
5. Dempke, W., et al., *Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy?* J Cancer Res Clin Oncol, 2001. **127**(7): p. 411-7.
6. Gupta, R.A. and R.N. Dubois, *Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(1): p. 11-21.
7. Tegeder, I., J. Pfeilschifter, and G. Geisslinger, *Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors*. FASEB J, 2001. **15**(12): p. 2057-72.
8. Kashfi, K. and B. Rigas, *Non-COX-2 targets and cancer: expanding the molecular target repertoire of chemoprevention*. Biochem Pharmacol, 2005. **70**(7): p. 969-86.
9. Rigas, B. and K. Kashfi, *Cancer prevention: a new era beyond cyclooxygenase-2*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **314**(1): p. 1-8.
10. Simonsen, T., et al., *Illustrert farmakologi - Bind 2*. 2004. pp. 247-248.
11. Rang, H.P., et al., *Pharmacology*. Fifth ed. 2003. pp. 693-698.
12. Rang, H.P., et al., *Pharmacology*. Fifth ed. 2003. pp. 244-250.
13. *Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell 2007*. 2007: Fagbokforlaget AS, Oslo. pp. 1113-1114.
14. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1871-5.
15. Rang, H.P., et al., *Pharmacology*. Fifth ed. 2003. pp. 231-234.
16. Dubois, R.N., et al., *Cyclooxygenase in biology and disease*. FASEB J, 1998. **12**(12): p. 1063-73.
17. Sugimoto, Y. and S. Narumiya, *Prostaglandin E receptors*. J Biol Chem, 2007. **282**(16): p. 11613-7.
18. Hull, M.A., S.C. Ko, and G. Hawcroft, *Prostaglandin EP receptors: targets for treatment and prevention of colorectal cancer?* Mol Cancer Ther, 2004. **3**(8): p. 1031-9.
19. Sheng, H., et al., *Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 18075-81.
20. Greenhough, A., et al., *The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment*. Carcinogenesis, 2009. **30**(3): p. 377-86.

21. Regan, J.W., *EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling*. Life Sciences, 2003. **74**: p. 143-153.
22. Wang, D. and R.N. DuBois, *Pro-inflammatory prostaglandins and progression of colorectal cancer*. Cancer Lett, 2008. **267**(2): p. 197-203.
23. Grosch, S., et al., *Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(11): p. 736-47.
24. Baek, S.J., et al., *Cyclooxygenase inhibitors induce the expression of the tumor suppressor gene EGR-1, which results in the up-regulation of NAG-1, an antitumorigenic protein*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(2): p. 356-64.
25. Baek, S.J., et al., *Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(4): p. 901-8.
26. Park, B.H., B. Breyer, and T.C. He, *Peroxisome proliferator-activated receptors: roles in tumorigenesis and chemoprevention in human cancer*. Curr Opin Oncol, 2001. **13**(1): p. 78-83.
27. Michalik, L., B. Desvergne, and W. Wahli, *Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(1): p. 61-70.
28. Vamecq, J. and N. Latruffe, *Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors*. Lancet, 1999. **354**(9173): p. 141-8.
29. Rang, H.P., et al., *Pharmacology*. Fifth ed. 2003. pp.390-392.
30. Voutsadakis, I.A., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and colorectal carcinogenesis*. J Cancer Res Clin Oncol, 2007. **133**(12): p. 917-28.
31. Wang, T., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in malignant diseases*. Crit Rev Oncol Hematol, 2006. **58**(1): p. 1-14.
32. Grommes, C., G.E. Landreth, and M.T. Heneka, *Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists*. Lancet Oncol, 2004. **5**(7): p. 419-29.
33. Robyr, P., Wolffe, A.P., Walhi, W., *Nuclear Hormone Receptor Coregulators in Action: Diversity For Shared Tasks*. Molecular Endocrinology, 2000. **14**: p. 329-347.
34. Na, H.K. and Y.J. Surh, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligands as bifunctional regulators of cell proliferation*. Biochem Pharmacol, 2003. **66**(8): p. 1381-91.
35. Sertznig, P., et al., *Present concepts and future outlook: function of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) for pathogenesis, progression, and therapy of cancer*. J Cell Physiol, 2007. **212**(1): p. 1-12.
36. Wang, D. and R.N. Dubois, *Peroxisome proliferator-activated receptors and progression of colorectal cancer*. PPAR Res, 2008. Article ID 931074.
37. Wang, D. and R.N. Dubois, *Prostaglandins and cancer*. Gut, 2006. **55**(1): p. 115-22.
38. Choi, I.K., et al., *PPAR-gamma ligand promotes the growth of APC-mutated HT-29 human colon cancer cells in vitro and in vivo*. Invest New Drugs, 2008. **26**(3): p. 283-8.

39. Lehmann, J.M., et al., *An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 12953-6.
40. Leesnitzer, L.M., et al., *Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662*. Biochemistry, 2002. **41**(21): p. 6640-50.
41. Seimandi, M., et al., *Differential responses of PPARalpha, PPARdelta, and PPARgamma reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands*. Anal Biochem, 2005. **344**(1): p. 8-15.
42. Hardman, J.G., Limbird, L.E., *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Tenth ed. 2001. pp. 691-708.
43. Fujino, H., et al., *Indomethacin decreases EP2 prostanoid receptor expression in colon cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **359**(3): p. 568-73.
44. Hawcroft, G., S.H. Gardner, and M.A. Hull, *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma does not explain the antiproliferative activity of the nonsteroidal anti-inflammatory drug indomethacin on human colorectal cancer cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **305**(2): p. 632-7.
45. Lehmann, J.M., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3406-10.
46. Shiff, S.J., et al., *Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells*. J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 491-503.
47. Andreassen, H.K., *Effekter av PPAR γ -agonist og NSAIDs i cellelinjer fra coloncancer: Medieres effekter av NSAIDs via PPAR γ ?, Farmakologisk Institutt*. 2009, Universitetet i Oslo.
48. Han, S. and J. Roman, *Suppression of prostaglandin E2 receptor subtype EP2 by PPARgamma ligands inhibits human lung carcinoma cell growth*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **314**(4): p. 1093-9.
49. Skomedal, T., et al., *A radioimmunoassay for cyclic AMP (cAMP) obtained by acetylation of both unlabeled and labeled (3H-cAMP) ligand, or of unlabeled ligand only*. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh), 1980. **46**(3): p. 200-4.
50. Sarraf, P., et al., *Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma*. Nat Med, 1998. **4**(9): p. 1046-52.
51. Banu, N., et al., *Inhibition of COX-2 with NS-398 decreases colon cancer cell motility through blocking epidermal growth factor receptor transactivation: possibilities for combination therapy*. Cell Prolif, 2007. **40**(5): p. 768-79.
52. Brockman, J.A., R.A. Gupta, and R.N. Dubois, *Activation of PPARgamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells*. Gastroenterology, 1998. **115**(5): p. 1049-55.
53. Bustin, S.A. and T. Nolan, *Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction*. J Biomol Tech, 2004. **15**(3): p. 155-66.

-
54. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol, 2000. **25**(2): p. 169-93.
 55. Seamon, K. and J.W. Daly, *Activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin does not require the guanine nucleotide regulatory protein*. J Biol Chem, 1981. **256**(19): p. 9799-801.
 56. Seamon, K.B., W. Padgett, and J.W. Daly, *Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(6): p. 3363-7.
 57. Laburthe, M., et al., *Vasoactive intestinal peptide: a potent stimulator of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate accumulation in gut carcinoma cell lines in culture*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(6): p. 2772-5.
 58. Lefkowitz, R.J. and M.G. Caron, *Adrenergic receptors. Models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins*. J Biol Chem, 1988. **263**(11): p. 4993-6.
 59. Wu, W.K., et al., *4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone from cigarette smoke stimulates colon cancer growth via beta-adrenoceptors*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 5272-7.
 60. Kambe, A., et al., *Regulation of EP4 expression via the Sp-1 transcription factor: inhibition of expression by anti-cancer agents*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(6): p. 1211-9.
 61. Williams, L.T., Lefkowitz, R.J., *Receptor Binding Studies in Adrenergic Pharmacology*. 1978: Raven Press, New York. Chapter 4, pp.27-31.
 62. Hazra, S., et al., *Pioglitazone and rosiglitazone decrease prostaglandin E2 in non-small-cell lung cancer cells by up-regulating 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase*. Mol Pharmacol, 2007. **71**(6): p. 1715-20.
 63. Tachibana, K., et al., *Gene expression profiling of potential peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) target genes in human hepatoblastoma cell lines inducibly expressing different PPAR isoforms*. Nucl Recept, 2005. **3**: p. 3.
 64. Seargent, J.M., E.A. Yates, and J.H. Gill, *GW9662, a potent antagonist of PPARgamma, inhibits growth of breast tumour cells and promotes the anticancer effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone, independently of PPARgamma activation*. Br J Pharmacol, 2004. **143**(8): p. 933-7.
 65. Kambe, A., et al., *The cyclooxygenase inhibitor sulindac sulfide inhibits EP4 expression and suppresses the growth of glioblastoma cells*. Cancer Prev Res (Phila Pa), 2009. **2**(12): p. 1088-99.
 66. Wick, M., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs mediating cyclooxygenase-independent inhibition of lung cancer cell growth*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(5): p. 1207-14.